

Q F=

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS

6/0156

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA APLICADA  
ÁREA DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS



**Desarrollo de cepas vínicas de  
*Saccharomyces cerevisiae* superproductoras  
de manoproteínas mediante técnicas de DNA  
recombinante, y su aplicación en enología**

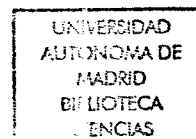
Memoria presentada por  
**Daniel González Ramos**  
para optar al grado de  
**Doctor en Ciencias**



5409264259

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA MADRID REGISTRO GENERAL	Entrada 001 N.º 200800016123 05/09/08 10:50:27
---	---

Trabajo realizado bajo la dirección del  
**Dr. Ramón González García**



INSTITUTO DE FERMENTACIONES INDUSTRIALES  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

D. RAMÓN GONZÁLEZ GARCÍA, DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS,  
INVESTIGADOR CIENTÍFICO DEL INSTITUTO DE  
FERMENTACIONES INDUSTRIALES DEL C.S.I.C.

**CERTIFICA:** Que la memoria titulada: “**Desarrollo de cepas vínicas de *Saccharomyces cerevisiae* superproductoras de manoproteínas mediante técnicas de DNA recombinante, y su aplicación en enología**” que presenta **D. Daniel González Ramos**, para optar al grado de doctor, ha sido realizada en el Instituto de Fermentaciones Industriales del C.S.I.C., bajo mi dirección.

Para dar cumplimiento a lo acordado por la Comisión de Doctorado de esta Universidad, firmo el presente certificado-autorización en Madrid a 1 de Septiembre de 2008.

Fdo. Dr. Ramón González

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo ha sido realizado gracias a la concesión de una beca para la formación de investigadores concedida por el Gobierno Vasco-Eusko Jurlaritz y a la dirección del Instituto de Fermentaciones Industriales (C.S.I.C.) que me han permitido disponer de sus instalaciones para la realización de la tesis doctoral.

En primer lugar quisiera agradecer al Dr. Ramón González García por haber sido un excelente director de tesis, sin cuya labor este trabajo no habría sido posible. Gracias Ramón por todo lo que de ti he aprendido, por haber confiado en mí y por haber sido tan paciente. Ha sido un verdadero placer haber hecho esta tesis contigo y me siento muy afortunado por ello.

A los doctores Alfonso Carrascosa y Rosario Muñoz, por haberme permitido realizar este trabajo en el Departamento de Microbiología del Instituto de Fermentaciones Industriales del CSIC, y por haber sido tan pacientes conmigo.

Al Dr. José María Barcenilla, Pepe, y a Maria Victoria Santamaría por el apoyo y la colaboración brindada, así como por su compañía en el laboratorio.

A los compañeros del laboratorio, gracias a cuya presencia, el tiempo de realización de este trabajo no habría sido tan ameno.

A Cris, por su comprensión, por su compañía, por su cariño, por su paciencia y sobre todo por ser ella misma haciéndome tan feliz.

A Pitu, además de por ser una persona excepcional y una amiga como las que no hay muchas, por haber contribuido más que nadie a que esta tesis llegue a buen puerto.

A mi madre, padre y hermanos, por ser siempre un apoyo y una referencia.



## **ÍNDICE**

<b>ÍNDICE DE CONTENIDOS.....</b>	<b>I</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>VII</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>XIII</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>XV</b>

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

### INTRODUCCIÓN

1. Características generales de las levaduras.....	3
2. La pared celular de las levaduras.....	4
2.1. Estructura y síntesis de la pared celular.....	5
2.1.1. $\beta$ -1,3-glucano.....	6
2.1.2. Quitina.....	8
2.1.3. $\beta$ -1,6-glucano.....	10
2.1.4. Manoproteínas.....	12
2.2. Regulación de la composición y estructura de la pared celular.....	18
2.2.1. Factores ambientales y del crecimiento.....	18
2.2.2. Condiciones de estrés. ....	19
2.3. Mutantes de delección en genes implicados en la síntesis o remodelación de la pared. ....	23
2.3.1. Genes implicados en la síntesis del $\beta$ -1,3-glucano. ....	24
2.3.2. Genes implicados en la regulación de la síntesis de la pared. ....	25
2.3.3. Genes implicados en la síntesis del anclaje GPI. ....	26
2.3.4. Otros genes. ....	27
3. Elaboración del vino. ....	28
4. Propiedades enológicas de las manoproteínas. ....	30
4.1. Protección frente a la quiebra proteica. ....	31
4.2. Protección frente a la precipitación tartárica. ....	37
4.3. Otras propiedades. ....	38
4.3.1. Adsorción de Ocratoxina A. ....	38
4.3.2. Retención de sustancias aromáticas. ....	38
4.3.3. Disminución de la astringencia. ....	38
4.3.4. Estabilización del color. ....	39

4.3.5. Estimulación del crecimiento de las bacterias lácticas. ....	39
4.3.6. Estabilización de la espuma en vinos espumosos. ....	39
4.4. Enriquecimiento del vino en manoproteínas ....	40
5. Aplicación de la ingeniería genética a la mejora de las levaduras vínicas. ....	41
5.1. Consideraciones generales. ....	41
5.1.1. Sistemas de transformación. ....	42
5.1.2. Vectores para la clonación de genes. ....	43
5.1.3. Marcadores de selección. ....	44
5.2. Especificidades de las levaduras vínicas. ....	44
5.3. Ejemplos de aplicaciones de mejora genética de levaduras vínicas mediante ingeniería genética. ....	47

## OBJETIVOS Y PLAN DE

TRABAJO.....	51
--------------	----

## MATERIALES Y MÉTODOS. ....

1. Cepas. ....	57
1.1. Cepas de <i>Escherichia coli</i> . ....	57
1.2. Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . ....	57
1.2.1. Cepas haploides de laboratorio.....	57
1.2.2. Cepas diploides de laboratorio. ....	58
1.2.3. Cepas vínicas. ....	59
1.3. Otras cepas de levadura. ....	59
2. Medios de cultivo. ....	60
2.1. Medios de cultivo de levaduras. ....	60
2.2. Medios de cultivo de bacterias. ....	62
3. Soluciones. ....	62
4. Cebadores. ....	63
5. Vectores. ....	65
6. Manipulación y análisis de ácidos nucleicos. ....	65
6.1. Aislamiento de DNA genómico de <i>S. cerevisiae</i> . ....	65
6.2. Aislamiento de DNA plasmídico de <i>E. coli</i> . ....	66
6.3. Electroforesis de DNA en geles de agarosa. ....	66
6.4. Digestión de DNA. ....	67

6.5. Ligación de fragmentos de DNA. ....	67
6.6. Amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR. ....	67
6.7. Clonación de secuencias en plásmidos mediante la técnica descrita por Geiser <i>et al.</i> (2001). ....	68
6.8. Construcción de cassettes de delección. ....	69
7. Métodos de transformación de microorganismos. ....	75
7.1. Transformación genética de <i>E. coli</i> por electroporación. ....	75
7.2. Transformación genética de <i>S. cerevisiae</i> . ....	76
8. Delección de genes en cepas vínicas de <i>S. cerevisiae</i> . ....	77
8.1. Transformación. ....	77
8.2. Análisis de los transformantes. ....	77
9. Medida de la liberación de polisacáridos. ....	79
9.1. Condiciones de cultivo. ....	79
9.2. Aislamiento de la fracción macromolecular presente en los sobrenadantes. ...	79
9.3. Cuantificación de polisacáridos totales. Método del fenol/sulfúrico.....	80
10. Detección de manoproteínas. ....	81
10.1. Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE. ....	81
10.2. Electrotransferencia. ....	81
10.3. Hibridación con Concanavalina-A marcada con Peroxidasa. ....	82
11. Estudios de fermentación y de estabilidad proteica. ....	82
11.1. Fermentación de mostos sintéticos y naturales. ....	82
11.2. Determinación del poder fermentativo. Cuantificación de azúcares, etanol y glicerol en vino mediante HPLC. ....	83
11.3. Medida de la estabilidad proteica vinos Sauvignon blanc. ....	83
11.4. Determinación de la concentración mínima de bentonita para la estabilización proteica de vinos Sauvignon blanc. ....	83
12. Determinación de resistencia a la toxina K9. ....	84
13. Determinación de fenotipo autolítico. ....	84
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>87</b>
1. Medida de la liberación de polisacáridos y manoproteínas en cepas de laboratorio. ....	89
1.1. Puesta a punto del ensayo de liberación de polisacáridos y manoproteínas en condiciones de laboratorio. ....	89

1.2. Liberación de polisacáridos y manoproteínas	
por cepas haploides de laboratorio.....	91
1.2.1. Cepas con fondo genético BY4741. ....	91
1.2.2. Cepas con fondo genético FY1679-08A. ....	93
1.2.3. Otros fondos genéticos. ....	95
1.3. Liberación de polisacáridos y manoproteínas	
por cepas diploides de laboratorio. ....	97
1.3.1. Cepas heterozigotas. ....	98
1.3.2. Cepas homozigotas. ....	99
1.4. Estudio de la estabilización proteica de las manoproteínas y	
polisacáridos liberados por cepas de laboratorio. ....	101
1.5. Discusión de los datos obtenidos con cepas de laboratorio. ....	104
2. Construcción de cepas de levaduras vínicas delecionadas	
en los genes <i>KNR4</i> , <i>GPI7</i> , <i>FKS1</i> y <i>GAS1</i> . ....	106
2.1. Construcción de cepas delecionadas en <i>KNR4</i> . ....	107
2.2. Construcción de cepas delecionadas en <i>GPI7</i> . ....	109
2.3. Construcción de cepas delecionadas en <i>FKS1</i> . ....	111
2.4. Construcción de cepas delecionadas en <i>GAS1</i> . ....	113
2.5. Discusión de la deleción de genes en cepas industriales. ....	114
3. Caracterización de cepas industriales delecionadas en los	
genes <i>KNR4</i> , <i>GPI7</i> , <i>FKS1</i> y <i>GAS1</i> . ....	117
3.1. Estudio de la liberación de manoproteínas y	
polisacáridos en condiciones de laboratorio. ....	117
3.2. Determinación de la capacidad autolítica ....	119
3.3. Determinación de la resistencia a la toxina K9. ....	120
3.4. Estudio de la capacidad fermentativa de mostos naturales. ....	122
3.4.1. Cepas delecionadas en <i>KNR4</i> . ....	124
3.4.2. Cepas delecionadas en <i>GPI7</i> . ....	127
3.4.3. Cepas delecionadas en <i>FKS1</i> . ....	130
3.4.4. Cepas delecionadas en <i>GAS1</i> . ....	131
3.4.5. Discusión de los resultados. . ....	134
3.5. Estabilidad proteica de los vinos naturales fermentados. . ....	136
3.5.1. Cepas delecionadas en <i>KNR4</i> . . ....	136

3.5.2. Cepas delecionadas en <i>GPI7</i> . . . . .	139
3.5.3. Cepas delecionadas en <i>FKSI</i> . . . . .	141
3.5.4. Cepas delecionadas en <i>GASI</i> . . . . .	142
3.5.5. Discusión de los resultados. . . . .	143
3.6. Determinación de la dosis mínima de bentonita necesaria para la estabilización de vinos naturales fermentados. . . . .	144
3.6.1. Cepas delecionadas en <i>KNR4</i> . . . . .	144
3.6.1.1.EKD-13. . . . .	144
3.6.1.2.TKD-124.....	148
3.6.2. Cepas delecionadas en <i>GPI7</i> . . . . .	151
3.6.2.1.EGD-13. . . . .	151
3.6.2.2.TGD-13.....	153
3.6.3. Cepas delecionadas en <i>FKSI</i> : EFD-31 .....	154
3.6.4. Cepas delecionadas en <i>GASI</i> : TGASD-13. ....	156
4. Discusión general.....	157
<b>CONCLUSIONES</b> .....	163
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> . ....	167

## ÍNDICE DE FIGURAS.

<b>Figura 1:</b> Esquema de la unión de las proteínas Pir al $\beta$ -1,3-glucano. <i>ASL</i> : enlace sensible a un álcali. Man: manosa. Ser: serina. Thr: treonina.....	14
<b>Figura 2:</b> Estructura del anclaje GPI Man: manosa, EtNH <sub>2</sub> : etanolamina, GlcNH <sub>2</sub> : N-acetil glucosamina, Ins: Inositol. Los números indican el átomo de C del monosacárido implicado en la formación del enlace. <i>Man1</i> , <i>Man2</i> , <i>Man3</i> y <i>Man4</i> , hacen referencia a la primera, segunda, tercera y cuarta manosa del anclaje GPI respectivamente (Pittet <i>et al.</i> 2007). ....	15
<b>Figura 3:</b> síntesis del anclaje GPI y su unión a proteína. Los números sobre las flechas indican el orden de la reacción en la síntesis del anclaje. En cada reacción se nombran los genes que codifican las enzimas implicadas en ella. (Pittet <i>et al.</i> 2007). ....	16
<b>Figura 4:</b> Unión de una proteína con anclaje GPI a la pared celular mediante su unión al $\beta$ -1,6-glucano. (A) Proteína con anclaje GPI: AA: residuo de amino ácido, EtN: etanolamina, P: fosfato, M: manosa, GN: N-acetil glucosamina, I: inositol. Unido al inositol se encuentra un fosfolípido que puede tener una base de glicerol o de esfingosina. (B) Escisión del anclaje GPI que mantiene la proteína unida a la membrana a través del residuo lipídico. La flecha indica el extremo reductor del oligomanano y la "X" indica un hipotético complejo proteico u otro "activador" (C) Formación del enlace glicosídico entre el GPI remanente de la proteína y el $\beta$ -1,6-glucano. G: glucosa (Lipke <i>et al.</i> 1998). ....	17
<b>Figura 5:</b> Esquema de la ruta CWI (Levin 2005). ....	20
<b>Figura 6:</b> Mecanismo mediante el cual las manoproteínas evitan la precipitación de los agregados formados entre proteínas de la uva desnaturalizadas y los taninos del vino (Zamora 2005). ....	36
<b>Figura 7:</b> Mapa de algunos plásmidos utilizados en el estudio. MCS ( <i>Multiple Cloning Site</i> o lugar múltiple de clonaje) es una región dentro del gen <i>LacZ<math>\alpha</math></i> en la que se encuentran varias dianas de restricción y por lo tanto es un punto donde clonar fragmentos de DNA mediante el sistema digestión/ligación. ....	65
<b>Figura 8:</b> Clonación de un fragmento de DNA amplificado por PCR en un plásmido mediante la técnica descrita por Geiser <i>et al.</i> (2001). ....	69
<b>Figura 9:</b> Mapa del plásmido pUCARO. ....	70
<b>Figura 10:</b> Mapa de los plásmidos pDKNR4-1, pDKNR4-2 y pDKNR4-3, que contienen los cassettes de delección DKNR4-1, DKNR4-2 y DKNR4-3 respectivamente. ....	71
<b>Figura 11:</b> Mapa del plásmido pDGPI7-1 que contiene el cassette de delección DGPI7-1. ....	72
<b>Figura 12:</b> Mapa de los plásmidos pDFKS1-1 y pDFKS1-2 que contienen los cassettes de delección DFKS1-1 y DFKS1-2 respectivamente. ....	72
<b>Figura 13:</b> Mapa del plásmido pDGAS1-1 que contiene el cassette de delección DGAS1-1. ....	73
<b>Figura 14:</b> Análisis de la delección de los diferentes genes mediante PCR. Las flechas rojas indican los lugares de hibridación de los cebadores empleados en la PCR a tiempo real, y las flechas azules los de los cebadores empleados en la PCR convencional. Prom: promotor del gen deleccionado. Term: terminador del gen deleccionado.....	78
<b>Figura 15:</b> Polisacáridos liberados durante el crecimiento en GCY de las cepas con fondo genético de BY4741. Se representan los valores medios y la desviación estándar de los datos de concentración de polisacáridos. BY4741 es la cepa control. A: Valores absolutos. B: Valores corregidos con la DO <sub>600</sub> . ....	92

<b>Figura 16:</b> Manoproteínas liberadas en medio GCY por las cepas con fondo BY4741. 1: FKS1-BY1, 2: GAS1-BY1, 3: GPI7-BY1, 4: YBR183w-BY1. 5: YDL231c-BY1, 6: YNL080c-BY1, 7: YOL092w-BY1, 8: KNR4-BY1, 9: BY4741 .....	93
<b>Figura 17:</b> Polisacáridos liberados durante el crecimiento en GCY de las cepas con fondo genético FY1679-08A. Se representan los valores medios y la desviación estándar de los datos de concentración de polisacáridos. FY1679-08A es la cepa control. A: Valores absolutos. B: Valores corregidos con la DO <sub>600</sub> . .....	94
<b>Figura 18:</b> Manoproteínas liberadas en medio GCY por las cepas de con fondo FY1679-08A. 1: GPI7-FY, 2: YDL231c-FY, 3: YNL080c-FY, 4: YBR183w-FY. 5: YNL294c-FY, 6: KNR4-FY, 7: FY1469-08A. ....	95
<b>Figura 19:</b> Polisacáridos liberados durante el crecimiento en GCY de las cepas con fondo genético de W303-1B y FY73. Se representan los valores medios y la desviación estándar de los datos de concentración de polisacáridos. W303 1B y FY73 son las cepas control de GAS1-W303 y de FZH respectivamente. A: Valores absolutos. B: Valores corregidos con la DO <sub>600</sub> . ....	96
<b>Figura 20:</b> Manoproteínas liberadas en medio GCY por las cepas de con fondo W303 1B y FY73. 1: GAS1-W303, 2: W303-1B, 3:FZH, 4:FY73. ....	96
<b>Figura 21:</b> Polisacáridos liberados durante el crecimiento en GCY de las cepas diploides delecionadas en una sola copia de los genes <i>FKS1</i> , <i>GAS1</i> , <i>GPI7</i> y <i>KNR4</i> respectivamente. Se representan los valores medios y la desviación estándar de los datos de concentración de polisacáridos. BY4743 es la cepa control. A: Valores absolutos. B: Valores corregidos con la DO <sub>600</sub> . ....	98
<b>Figura 22:</b> Manoproteínas liberadas en medio GCY por las cepas diploides heterozigotas. 1: FKS1-BY2, 2: GAS1-BY2, 3: GPI7-BY2, 4: KNR4-BY2. 5: BY4743. ....	99
<b>Figura 23:</b> Polisacáridos liberados durante el crecimiento en GCY de las cepas diploides delecionadas en todas las copias de los genes <i>FKS1</i> , <i>GAS1</i> , <i>GPI7</i> y <i>KNR4</i> respectivamente. Se representan los valores medios y la desviación estándar de los datos de concentración de polisacáridos. BY4743 es la cepa control. A: Valores absolutos. B: Valores corregidos con la DO <sub>600</sub> . ....	100
<b>Figura 24:</b> Manoproteínas liberadas en medio GCY por las cepas diploides homozigotas. 1: FKS1-BY3, 2: GAS1-BY3, 3: GPI7-BY3 4: KNR4-BY3. 5: BY4743. ....	100
<b>Figura 25:</b> Turbidez de dos vinos en los que se ha inducido la quiebra proteica por calor, uno sin tratar, y el otro tratado con 0,25 g/l de invertasa.....	101
<b>Figura 26:</b> Turbidez de vinos en los que se ha inducido la quiebra proteica, tratados con el material liberado durante el crecimiento en GCY por las cepas control.....	102
<b>Figura 27:</b> Turbidez de los vinos en los que se ha inducido la quiebra proteica, tratados con el material liberado durante el crecimiento en GCY por parte de las cepas con fondo BY4741 seleccionadas en la primera fase del estudio. ....	103
<b>Figura 28:</b> Turbidez de los vinos en los que se ha inducido la quiebra proteica, tratados con el material liberado durante el crecimiento en GCY por parte de las cepas que se indican. ....	103
<b>Figura 29:</b> Tamaño de los fragmentos esperados en la amplificación mediante PCR del <i>locus KNR4</i> , en función del gen marcador que reemplace la ORF. pKNR4 y tKNR4 indican el promotor y terminador de <i>KNR4</i> respectivamente. ....	107
<b>Figura 30:</b> Amplificación por PCR del <i>locus KNR4</i> a partir de gDNA de diferentes cepas. 1: T74-3, 2: TKD/2-1, 3: TKD-12, 4: TKD-123, 5: EC1118, 6: EKD/2-1, 7: EKD-13. a: <i>KNR4</i> delecionado con <i>ARO4-OPF</i> , b: <i>KNR4</i> delecionado con <i>kanMX4</i> , c: <i>locus</i> original de <i>KNR4</i> , d: <i>KNR4</i> delecionado con <i>URA3</i> . ....	108



<b>Figura 31:</b> Tamaño de los fragmentos esperados en la amplificación mediante PCR convencional del <i>locus GPI7</i> , en función de si la ORF está reemplazada por los diferentes genes marcadores. pGPI7 y tGPI7 indican el promotor y terminador de <i>GPI7</i> respectivamente. ....	109
<b>Figura 32:</b> Amplificación por PCR del <i>locus GPI7</i> a partir de gDNA de diferentes cepas, realizada tras la transformación de T73-4 con DGPI7-1. 1-4: transformantes 1-4, 5: T73-4. a: <i>locus</i> original de <i>GPI7</i> . b: <i>locus</i> deleciónado con <i>ARO4-OF</i> P. ....	109
<b>Figura 33:</b> Amplificación por PCR del <i>locus GPI7</i> a partir de gDNA de diferentes cepas, tras la transformación de TGD/2-1 con DGPI7-3. 1-4: transformantes 1-4, 5: T73-4, 6-10: transformantes 5-9, 11: TGD/2-1, 12-14: transformantes 10-12. a: <i>locus</i> original, b: <i>locus</i> deleciónado con <i>ARO4-OF</i> P, c: <i>locus</i> deleciónado con <i>kanMX4</i> . ....	110
<b>Figura 34:</b> Amplificación por PCR del <i>locus GPI7</i> a partir de gDNA de diferentes cepas, realizada tras la transformación de EC1118 con DGPI7-1. 1-6: transformantes 1-6. 7: EC1118. a: <i>locus</i> original de <i>GPI7</i> , b: <i>GPI7</i> deleciónado con <i>ARO4-OF</i> P. ....	111
<b>Figura 35:</b> Amplificación por PCR del <i>locus GPI7</i> a partir de gDNA de diferentes cepas, realizada tras la transformación de EGD/2-1 con DGPI7-3. 1-2: transformantes 1-2, 3: EC111, 4-9: transformantes 3-8. a: <i>locus</i> original de <i>GPI7</i> , b: <i>GPI7</i> deleciónado con <i>ARO4-OF</i> P, c: <i>GPI7</i> deleciónado con <i>kanMX4</i> . ....	111
<b>Figura 36:</b> Tamaño de los fragmentos esperados en la amplificación mediante PCR del <i>locus FKS1</i> , en función de si la ORF está reemplazada por los diferentes genes marcadores. ....	112
<b>Figura 37:</b> Amplificación por PCR del <i>locus FKS1</i> a partir de gDNA de diferentes cepas. 1: EC1118, 2: EFD/2-3, 3: EFD-31, 4: T73-4, 5: TFD/2-3, 6: TFD-31. a: <i>locus</i> original de <i>FKS1</i> , b: <i>FKS1</i> deleciónado con <i>ARO4-OF</i> P, c: <i>FKS1</i> deleciónado con <i>kanMX4</i> . ....	112
<b>Figura 38:</b> Tamaño de los fragmentos posibles en la amplificación del <i>locus GAS1</i> mediante PCR. ....	113
<b>Figura 37:</b> Amplificación por PCR del <i>locus GAS1</i> a partir de gDNA de diferentes cepas. 1: T73-4, 2: TGASD/2-3, 3: TGASD-31. a: <i>GAS1</i> deleciónado con <i>ARO4-OF</i> P, b: <i>locus</i> original de <i>GAS1</i> , c: <i>GAS1</i> deleciónado con <i>kanMX4</i> . ....	114
<b>Figura 38:</b> Polisacáridos liberados durante el crecimiento en GCY por parte de las cepas industriales construidas. A: Cepas deleciónadas en <i>KNR4</i> y sus controles. B: Cepas deleciónadas en <i>GPI7</i> y sus controles. C: Cepas deleciónadas en <i>FKS1</i> y sus controles. D: Cepas deleciónadas en <i>GAS1</i> y sus controles. ....	118
<b>Figura 39:</b> Determinación del fenotipo autolítico de las cepas industriales deleciónadas en todas las copias de los genes. ....	120
<b>Figura 40:</b> Crecimiento en YPD y en YPD+ K9 de las cepas con fondo genético de EC1118 deleciónadas en todas las copias de los genes <i>KNR4</i> , <i>GPI7</i> y <i>FKS1</i> . ....	121
<b>Figura 41:</b> Crecimiento en YPD y en YPD+ K9 de las cepas con fondo genético de T73-4 deleciónadas en todas las copias de los genes <i>KNR4</i> , <i>GPI7</i> y <i>GAS1</i> . ....	122
<b>Figura 42:</b> Cinética de fermentación de varios mostos <i>Sauvignon Blanc</i> fermentados por la cepa EKD-13 y EC1118. Las figuras A y B corresponden a dos fermentaciones de mosto de 2007 (25% (p/v) de azúcar) y, C y D de mosto 2006 (33 % (p/v) de azúcar). En la tabla se indican las concentraciones de glucosa, fructosa, glicerol y etanol de los diferentes vinos. ....	125
<b>Figura 43:</b> Cinética de fermentación de varios mostos <i>Sauvignon Blanc</i> fermentados por la cepa TKD-123 y T73-4. Las figuras A y B corresponden a dos fermentaciones de mosto de 2007 (25% (p/v) de azúcar) y, C y D de mosto 2006 (33 % (p/v) de azúcar). En la tabla se indican las concentraciones de glucosa, fructosa, glicerol y etanol de los diferentes vinos. ....	126

<b>Figura 44:</b> Cinética de fermentación de varios mostos <i>Sauvignon Blanc</i> fermentados por la cepa EGD-13 y EC1118. Las figuras A y B corresponden a dos fermentaciones de mosto de 2007 (25% (p/v) de azúcar) y, C y D de mosto 2006 (33 % (p/v) de azúcar). n.a. (no analizado). En la tabla se indican las concentraciones de glucosa, fructosa, glicerol y etanol de los diferentes vinos. ....	128
<b>Figura 45:</b> Cinética de fermentación de varios mostos <i>Sauvignon Blanc</i> fermentados por la cepa TGD-13 y T73-4. Las figuras A y B corresponden a dos fermentaciones de mosto de 2007 (25% (p/v) de azúcar) y, C y D de mosto 2006 (33 % (p/v) de azúcar). En la tabla se indican las concentraciones de glucosa, fructosa, glicerol y etanol de los diferentes vinos. ....	129
<b>Figura 46:</b> Cinética de fermentación de varios mostos <i>Sauvignon Blanc</i> fermentados por la cepa EFD-31 y EC1118. Las figuras A y B corresponden a dos fermentaciones de mosto de 2007 (25% (p/v) de azúcar) y, C y D de mosto 2006 (33 % (p/v) de azúcar). En la tabla se indican las concentraciones de glucosa, fructosa, glicerol y etanol de los diferentes vinos. ....	131
<b>Figura 47:</b> Se muestra la cinética de fermentación de varios mostos <i>Sauvignon Blanc</i> fermentados por la cepa TGASD-31 y T73-4. Las figuras A y B corresponden a dos fermentaciones de mosto de 2007 (25% (p/v) de azúcar) y, C y D de mosto 2006 (33 % (p/v) de azúcar). En la tabla se indican las concentraciones de glucosa, fructosa, glicerol y etanol de los diferentes vinos. ....	133
<b>Figura 48:</b> Turbidez de los vinos fermentados por EKD-13 y EC1118 en los que se indujo la quiebra proteica. A y B corresponden a los vinos de 2007 y C y D a los de 2006 cuyas cinéticas de fermentación se muestran en la figura 42. ....	137
<b>Figura 49:</b> Turbidez de los vinos fermentados por TKD-123 y T73-4 en los que se indujo la quiebra proteica. A y B corresponden a los vinos de 2007 y C y D a los de 2006 cuyas cinéticas de fermentación se muestran en la figura 43. ....	138
<b>Figura 50:</b> Turbidez de los vinos fermentados por EGD-13 y EC1118 en los que se indujo la quiebra proteica. A y B corresponden a los vinos de 2007 y C a los de 2006 cuyas cinéticas de fermentación se muestran en la figura 44. ....	140
<b>Figura 51:</b> Turbidez de los vinos fermentados por TGD-13 y T73-4 en los que se indujo la quiebra proteica. A y B corresponden a los vinos de 2007 y C y D a los de 2006 cuyas cinéticas de fermentación se muestran en la figura 45. ....	141
<b>Figura 52:</b> Turbidez de los vinos fermentados por EFD-31 y EC1118 en los que se indujo la quiebra proteica. A y B corresponden a los vinos de 2007 y C y D a los de 2006 cuyas cinéticas de fermentación se muestran en la figura 46. ....	142
<b>Figura 53:</b> Turbidez de los vinos procedentes de mosto de 2007 fermentados por TGASD-13 y T73-4, en los que se indujo la quiebra proteica. ....	143
<b>Figura 54:</b> Estabilización por bentonita de los vinos fermentados por las cepas EC1118 y EKD-13. ....	145
<b>Figura 55:</b> Detección con Concanavalina A marcada con peroxidasa de las proteínas presentes en el mosto y en un vino fermentado por EFD-31. ....	145
<b>Figura 56:</b> Detección mediante Concanavalina A marcada con peroxidasa de las manoproteínas presentes en los vinos fermentados por EC1118 y EKD-13, y tratados con concentraciones crecientes de bentonita. La imagen de la izquierda corresponde a los vinos sin tratar y los números indican los g/hl de bentonita usados en el tratamiento de los vinos. ....	147
<b>Figura 57:</b> Estabilización por bentonita de los vinos fermentados por las cepas T73-4 y TKD-123. ....	148

<b>Figura 58:</b> Detección mediante Concanavalina A marcada con peroxidasa de las manoproteínas presentes en los vinos fermentados por T73-4 y TKD-123 y tratados con diferentes dosis de bentonita. La imagen de la izquierda corresponde a los vinos sin tratar y los números indican los g/hl de bentonita usados en el tratamiento de los vinos. ....	<b>149</b>
<b>Figura 59:</b> Estabilización por bentonita de los vinos fermentados por las cepas EC1118 y EGD-13. ....	<b>151</b>
<b>Figura 60:</b> Detección mediante Concanavalina A marcada con peroxidasa de las manoproteínas presentes en los vinos fermentados por EC1118 y EGD-13, y tratados con concentraciones crecientes de bentonita. La imagen de la izquierda corresponde a los vinos sin tratar y los números indican los g/hl de bentonita usados en el tratamiento de los vinos. ....	<b>152</b>
<b>Figura 61:</b> Estabilización por bentonita de los vinos fermentados por las cepas T73-4 y TGD-13. ....	<b>153</b>
<b>Figura 62:</b> Detección mediante Concanavalina A marcada con peroxidasa de las manoproteínas presentes en los vinos fermentados por T73-4 y TGD-13 y tratados con diferentes dosis de bentonita. La imagen de la izquierda corresponde a los vinos sin tratar y los números indican los g/hl de bentonita usados en el tratamiento de los vinos. ....	<b>154</b>
<b>Figura 63:</b> Estabilización por bentonita de los vinos fermentados por las cepas EC1118 y EFD-31. ....	<b>155</b>
<b>Figura 64:</b> Detección mediante Concanavalina A marcada con peroxidasa de las manoproteínas presentes en los vinos fermentados por EC1118 y EFD-31, y tratados con concentraciones crecientes de bentonita. La imagen de la izquierda corresponde a los vinos sin tratar y los números indican los g/hl de bentonita usados en el tratamiento de los vinos. ....	<b>155</b>
<b>Figura 65:</b> Estabilización por bentonita de los vinos fermentados por las cepas T73-4 y TGASD-31. ....	<b>156</b>
<b>Figura 66:</b> Detección mediante Concanavalina A marcada con peroxidasa de las manoproteínas presentes en los vinos fermentados por T73-4 y TGD-13 y tratados con diferentes dosis de bentonita. La imagen de la izquierda corresponde a los vinos sin tratar y los números indican los g/hl de bentonita usados en el tratamiento de los vinos. ....	<b>157</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Cebadores empleados en la construcción de cassettes de delección.....	<b>64</b>
<b>Tabla 2:</b> cebadores para la confirmación mediante PCR de la delección de genes. ....	<b>64</b>
<b>Tabla 3:</b> Cassettes de delección utilizados para deleccionar cada copia de los diferentes genes, marcador de selección que contienen, y DNA molde y pareja de cebadores utilizados para su amplificación por PCR. ....	<b>74</b>
<b>Tabla 4:</b> Tiempo invertido en alcanzar la fase estacionaria y DO <sub>600</sub> alcanzada por parte de las cepas delecionadas en <i>KNR4</i> y sus respectivas cepas parentales. ....	<b>117</b>

## ABREVIATURAS

A	Adenina
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> ó análisis de la varianza
ATP	Adenosine Triphosphate ó Adenosina trifosfato
ATPasa	ATP defosforilasa
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
BSA	Bovine Serum Albumin ó Seroalbúmina bovina
C	Citosina
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate ó adenosina 5' monofosfato cíclico
CSIC	Consejo Superior de Investigaciones Científicas
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
dCTP	Desoxicitidina trifosfato
dGTP	Desoxiguanidina trifosfato
DNA	Deoxyribonucleic acid ó Ácido desoxirribonucleico
DO <sub>600</sub>	Densidad óptica a 600 nm.
dTTP	Desoxitimidina trifosfato
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid ó Ácido etilén diamino tatreacético
Euroscarf	European <i>Saccharomyces cerevisiae</i> archive for functional analysis
G	Guanina
G418	Geneticina
gDNA	Genomic DNA ó DNA genómico
HPLC	High pressure liquid chromatography ó cromatografía líquida a alta presión
IFI	Instituto de Fermentaciones Industriales
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-thiogalactopiranósido
KCl	Cloruro potásico
kDa	Kilodalton
Kb	Miles de pares de bases
LB	Medio Luria-Bertani
LBA	LB con ampicilina

LiAc	<i>Lithium Acetate</i> ó Acetato de litio
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i> ó lugar de clonación múltiple
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro magnésico
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato magnésico
NaCl	Cloruro sódico
OFP	<i>orto</i> - fluoro-DL-fenilalanina
ORF	<i>Open Reading Frame</i> ó Marco abierta de lectura
p/v	Peso/volumen
pb	Pares de bases
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> ó Reacción en cadena de la polimerasa
PFP	<i>para</i> -fluoro-DL- fenilalanina
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PI	Fosfatidil inositol
PVDF	<i>Polyvinylidene fluoride</i> ó fluoruro de polivinilideno
RNasa	Ribonucleasa
rpm	Revoluciones por minuto
SE	Sorbitol <i>EDTA</i>
Ser	Serina
SDS	<i>Sodium Dodecil Sulphate</i> ó Dodecil sulfato sódico
PAGE	<i>Polyacrilamide Gel Electrophoresis</i> ó electroforesis en gel de poliacrilamida
SOC	Medio rico para el crecimiento de bacterias.
SS-DNA	<i>Single Stranded-DNA</i> ó DNA de cadena simple
T	Timina
TAE	<i>Tris Ácido Acetico EDTA</i>
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
Thr	Treonina
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
TE	<i>Tris EDTA</i>
U	Uracilo
U	Unidad de actividad enzimática
v/v	Volumen/volumen

X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indoil- $\beta$ -D-galactopiranósido
YE <sub>p</sub>	<i>Yeast Episomic plasmid</i> ó Plásmido episómico de levaduras
YPD	<i>Yeast extract Peptone Dextrose</i> , medio rico de levaduras

# **INTRODUCCIÓN**



## 1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS LEVADURAS.

Las levaduras son microorganismos eucariotas clasificados en el reino Fungi y constan de alrededor de 1.500 especies descritas. De acuerdo con el modo de formación de esporas, pueden clasificarse en Ascomicetes y Basidiomicetes. *Saccharomyces cerevisiae* es una especie de levadura perteneciente al grupo de los Ascomicetes, muy utilizado como sistema modelo eucariota debido a la rapidez de su crecimiento, su facilidad de réplica en placa y de aislamiento de mutantes, a su sistema genético bien definido así como por ser una fuente barata para estudios bioquímicos (Sherman 1998). De hecho, el genoma de la cepa de *S. cerevisiae* S288C se encuentra completamente secuenciado (Goffeau *et al.* 1996) y otras cepas y especies también están siendo secuenciadas completamente, siendo ésta una herramienta muy importante en los estudios genéticos.

*S. cerevisiae* es un organismo anaerobio facultativo, capaz de desarrollar un metabolismo oxidativo, en presencia de oxígeno, y fermentativo en su ausencia. Presenta el fenómeno de represión catabólica mediante el cual, en presencia de glucosa o de algún otro azúcar fermentable como fructosa, se encuentran reprimidos entre otros, los genes necesarios para la respiración. En presencia de oxígeno su metabolismo pasa por las siguientes fases. Durante la fase exponencial del crecimiento, obtiene la energía procedente de la fermentación. Cuando los azúcares se agotan, tiene lugar la desrepresión de los genes implicados en la respiración y la célula sufre una adaptación hacia un metabolismo respiratorio (denominada pausa diáuxica). Durante la fase post-diáuxica, las células de *S. cerevisiae* obtienen energía de la respiración reproduciéndose a una velocidad menor que durante la fase exponencial. Una vez agotados los nutrientes, la célula deja de dividirse y entra en fase estacionaria (Werner-Washburne *et al.* 1993).

*S. cerevisiae* tiene un ciclo de división asexual (denominado crecimiento vegetativo) y otro ciclo de reproducción sexual. El crecimiento vegetativo se lleva a cabo por gemación. La división es asimétrica siendo la célula madre de mayor tamaño que la hija (Gershon *et al.* 2000). *S. cerevisiae* presenta un ciclo celular típico con fases M-G1-S-G2. Durante el ciclo de reproducción sexual, dos células haploides de tipo sexual complementario son capaces de conjugarse (en fase G1) para dar lugar a una célula diploide que en condiciones favorables puede reproducirse vegetativamente. En

condiciones de ayuno puede esporular y originar, por medio del proceso de meiosis, cuatro ascosporas haploides. El cigoto se desarrolla dentro de una estructura en forma de saco, el asca, mientras el núcleo sufre dos divisiones meióticas, con frecuencia seguidas de una o más divisiones mitóticas. En torno a cada núcleo hijo y el citoplasma circundante, se forma una pared originando cuatro ascosporas dentro del asca. Después ésta se rompe y se liberan las ascosporas allí encerradas, que pueden germinar y producir nuevas células vegetativas.

## **2. LA PARED CELULAR DE LAS LEVADURAS.**

Las células de *S. cerevisiae*, al igual que las del resto de los hongos y que las células vegetales, están recubiertas de una pared celular, siendo ésta esencial para su supervivencia (Cabib *et al.* 2001). La pared es una estructura importante para las células, de hecho, dependiendo de las condiciones de crecimiento y de cultivo, puede llegar a constituir hasta el 30% de su peso seco (Klis 1994, Lesage *et al.* 2006, Klis *et al.* 2006). Por ello, *S. cerevisiae* invierte una considerable cantidad de energía en su construcción y mantenimiento (Klis *et al.* 2006).

La pared celular tiene 4 funciones principales (Klis *et al.* 2006):

1. *Estabilización de las condiciones osmóticas internas.* La osmolaridad del citoplasma de *S. cerevisiae* y de otros hongos es generalmente mayor que la del espacio extracelular, y bajo estas condiciones el agua tiene tendencia a entrar en las células. La pared celular, crea una presión contraria limitando el influjo de agua que perturbaría las condiciones internas de la célula y causaría el hinchamiento de las mismas, pudiendo conducir a una ruptura de la membrana plasmática.
2. *Protección contra el estrés físico.* La pared de la célula no sólo está implicada en mantener la homeostasis osmótica, sino que también desempeña funciones de capa protectora. La combinación de una considerable rigidez y gran elasticidad, permite a la pared transmitir y redistribuir tensiones físicas, y así confiere una protección eficiente contra daños mecánicos.

3. *Mantenimiento de la forma celular.* Las levaduras pueden crecer como células ovales, o en una forma más alargada ante la escasez de nitrógeno o durante el crecimiento pseudohifal. La formación de una estructura de unión en respuesta a la feromona de células del sexo opuesto también ilustra esta función.

4. *Servir de andamio para el anclaje de proteínas.* Los polisacáridos de la pared celular de las levaduras sirven de andamio para el anclaje de las glicoproteínas de la capa externa. Estas glicoproteínas y particularmente las cadenas laterales de polisacáridos unidas a la parte proteica, limitan la permeabilidad de la pared celular a algunas macromoléculas, protegiendo a los polisacáridos estructurales del ataque de proteínas externas. Además, también podrían limitar el escape al medio de los intermediarios solubles en la construcción de la pared. La permeabilidad limitada de la capa externa de proteínas, podría crear un microambiente en la región interna de la pared celular adyacente a la membrana plasmática. El alto grado de glicosilación de las proteínas de la pared celular, unido a la presencia de grupos fosfato cargados negativamente en sus cadenas laterales de polisacáridos, contribuiría a la retención de agua.

## 2.1. Estructura y síntesis de la pared celular.

La pared celular es una estructura de naturaleza dinámica, su composición y arquitectura pueden variar ampliamente en respuesta a cambios del medio de cultivo y también a lo largo de la fase de crecimiento. Además, cuando células haploides encuentran una feromona del sexo opuesto, dejan de dividirse y forman una estructura de conexión con el otro sexo, que contiene una composición de la pared diferente (Klis *et al.* 1994).

En células vegetativas, la pared está compuesta típicamente por  $\beta$ -1,3-glucano (50-55% del peso seco de la pared), quitina (1-2%),  $\beta$ -1,6-glucano (3-14%) y manoproteínas (35-40%). Estudios de microscopía electrónica han revelado una estructura con dos capas bien diferenciadas. La capa interna es la responsable de la resistencia mecánica de la pared y está compuesta por  $\beta$ -1,3-glucano y quitina. La capa

externa es responsable de la permeabilidad celular y está compuesta por  $\beta$ -1,6-glucano y manoproteínas (Klis *et al.* 2002).

La célula utiliza dos vías para la síntesis de los diferentes componentes de la pared. El  $\beta$ -1,3-glucano y la quitina son sintetizados por complejos enzimáticos unidos a la membrana plasmática, que extruden polímeros *in statu nascendi* en la región periplásmica. Las manoproteínas, por el contrario, son sintetizadas y glicosiladas intracelularmente, y transportadas mediante la ruta secretora a la región extracelular, donde son ensambladas. Esto implica que las mutaciones que afecten a la ruta secretora afectarán indirectamente a la composición y estructura de la pared celular (Klis *et al.* 1994)

### 2.1.1. $\beta$ -1,3-glucano.

El  $\beta$ -1,3-glucano es el componente estructural mayoritario de la pared celular (Klis 1994, Klis *et al.* 2006, Cabib *et al.* 2001) y el principal responsable de la resistencia mecánica de la misma (Klis *et al.* 2002). En fase estacionaria, puede estar compuesto por hasta 1.500 monómeros de glucosa unidos mediante enlaces  $\beta$ -1,3 (Lesage *et al.* 2006). La mayor parte del  $\beta$ -1,3-glucano está dispuesto en una conformación helicoidal, estando las fibras formadas por una o más cadenas de polisacárido unidas mediante puentes de hidrógeno. Estas fibras forman una red densamente interconectada, en la que se anclan otros componentes de la pared celular, a través de los extremos no reductores del  $\beta$ -1,3-glucano. En la parte externa de la matriz de  $\beta$ -1,3-glucano se pueden encontrar unidas al mismo, moléculas altamente ramificadas de  $\beta$ -1,6-glucano, que a su vez pueden estar unidas a las manoproteínas. En la parte interna por el contrario, se pueden encontrar cadenas de quitina unidas mediante un enlace  $\beta$ -1,4 (Klis *et al.* 2006). La síntesis de la matriz de  $\beta$ -1,3-glucano es un proceso que se lleva a cabo en sucesivas fases. En primer lugar se sintetizan en la membrana plasmática cadenas lineales que son liberadas durante su síntesis al espacio periplasmático. Posteriormente las cadenas son ramificadas por la unión de una glucosa mediante un enlace  $\beta$ -1,6 y se produce la elongación de la ramificación. Esto da lugar a moléculas de  $\beta$ -1,3-glucano muy ramificadas, con numerosos extremos no reductores que sirven de puntos de unión al  $\beta$ -1,6-glucano y a la quitina (Mouyna *et al.* 2000).

La síntesis del  $\beta$ -1,3-glucano es llevada a cabo por el complejo  $\beta$ -1,3-glucano sintasa, que cataliza la transferencia de unidades de UDP-glucosa a una cadena de residuos unidos mediante enlaces  $\beta$ -1,3. Se trata de una enzima de membrana activada por GTP en la que se pueden distinguir una fracción soluble (de unión a GTP) y una fracción catalítica (Kang *et al.* 1986, Douglas *et al.* 1994). La subunidad catalítica está codificada por los genes *FKS1* y *FKS2* (Douglas *et al.* 1994, Mazur *et al.* 1995). La delección simultánea de *FKS1* y *FKS2* es letal, sugiriendo que Fks1p y Fks2p son subunidades alternativas de la  $\beta$ -1,3-glucano sintasa (Mazur *et al.* 1995).

*FKS1* (de FK506 sensitive) (Parent *et al.* 1993, Eng *et al.* 1994, Lesage *et al.* 2006) codifica una proteína integral de membrana de 1876 aminoácidos y 215-kDa con 16 segmentos transmembrana (Douglas *et al.* 1994, Lesage *et al.* 2006). El elevado número de segmentos transmembrana de Fks1p y su similitud topológica con otros transportadores de membrana, sugieren que podría estar implicada en el transporte del polímero de glucano creciente, a través de la membrana (Douglas *et al.* 1994). La expresión de *FKS1* está regulada a lo largo del ciclo celular, siendo importante para la síntesis del  $\beta$ -1,3-glucano en la gema creciente, durante el crecimiento en glucosa como fuente de carbono (Mazur *et al.* 1995).

*FKS2* codifica una proteína de 1895 aa y 217 kDa con un 88% de identidad con Fks1p (Mazur *et al.* 1995, Dijkgraaf *et al.* 2002), y es esencial para la esporulación, proceso que se da lugar en ausencia de nutrientes. La expresión de *FKS1* y *FKS2* está regulada de manera contraria. Mientras que *FKS1* se expresa durante el crecimiento en glucosa, *FKS2* lo hace en su ausencia (sufre represión catabólica por glucosa). Lo mismo sucede en presencia de feromona y de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ , la expresión de *FKS2* se ve inducida mientras que la de *FKS1* se ve reprimida (Mazur *et al.* 1995).

*FKS3* es el tercer gen de la familia *FKS* y su producto génico, Fks3p, tiene un 55% de identidad con Fks1p y Fks2p (Mazur *et al.* 1995). Fks3p es necesaria para la normal formación de la pared celular en la espora, afectando la regulación *upstream* de la  $\beta$ -1,3-glucano sintasa (Ishihara *et al.* 2007).

La subunidad reguladora de la  $\beta$ -1,3-glucano sintasa está codificada por el gen *RHO1* (Cabib *et al.* 1998). Rho1p es una proteína esencial de 24 kDa del tipo de las proteínas G y regula la actividad de la  $\beta$ -1,3-glucano sintasa a lo largo del ciclo celular, alternando entre una forma activa unida a GTP y una forma inactiva unida a GDP (Cabib *et al.* 1998, Lesage *et al.* 2006).

Una vez sintetizadas las cadenas lineales de  $\beta$ -1,3-glucano, deben ser incorporadas a la pared celular en crecimiento. Bgl2p, es una endotransglicosilasa responsable de la introducción de enlaces  $\beta$ -1,6 dentro de las cadenas de  $\beta$ -1,3-glucano (Goldman *et al.* 1995, Klis *et al.* 2002). La elongación de estas ramificaciones es llevada a cabo por Gas1p, una  $\beta$ -1,3-glucanosil transferasa (Popolo *et al.* 1999, Mouyna *et al.* 2000, Klis *et al.* 2002). Gas1p escinde internamente una molécula lineal de  $\beta$ -1,3-glucano y transfiere una parte a una nueva ramificación creada, resultando en la elongación de la misma (Mouyna *et al.* 2000). Se trata de una proteína de 125 kDa unida a la cara externa de la membrana plasmática mediante un enlace GPI (Conzelmann *et al.* 1988, Nuoffer *et al.* 1991), cuya expresión está relacionada con el crecimiento celular y es estimulada por cAMP (Grandori *et al.* 1990, Popolo *et al.* 1993).

### 2.1.2. Quitina.

La quitina, es el polímero menos abundante de la pared celular, constituyendo solamente un 1-2% del peso seco de la misma (Lesage *et al.* 2006, Klis 1994, Cid *et al.* 1995). A pesar de su pequeña proporción es esencial para la supervivencia celular (Cabib *et al.* 2001). Es un polímero lineal de residuos de N-acetilglucosamina unidos mediante enlaces  $\beta$ -1,4 (Cid *et al.* 1995), y en torno al 50% de las cadenas se encuentran unidas al extremo no-reductor de las moléculas de  $\beta$ -1,3-glucano mediante un enlace  $\beta$ -1,4 (Lesage *et al.* 2006). La quitina se localiza principalmente formando un anillo en el cuello de la célula madre, en el septo primario y en la cicatriz de gemación (Klis *et al.* 2006), donde forma moléculas de en torno a los 190 residuos de N-acetilglucosamina. También se puede encontrar, aunque en menor medida, uniformemente dispersa en las paredes laterales de la célula, donde forma moléculas de menor longitud (alrededor de 100 residuos de N-acetilglucosamina por molécula) (Lesage *et al.* 2006). La pared

lateral de la yema en crecimiento no contiene quitina y ésta solamente se deposita ahí una vez se ha producido la citoquinesis, indicando que la quitina no es esencial para su resistencia mecánica (Klis et al. 2006).

La deposición de la quitina en la pared celular es un proceso controlado de manera muy precisa tanto espacial como temporalmente. En la fase G1 tardía, se deposita en forma de disco en el lugar donde emerge una nueva gema, posteriormente como un disco (el septo primario) y finalmente en la pared lateral de la célula madre tras la septación (Cabib *et al.* 2001, Lesage *et al.* 2006). La actividad quitina sintasa se localiza en la membrana plasmática, donde tiene lugar la síntesis de quitina, aunque también está presente en vesículas intracelulares llamadas quitosomas que parecen liberar actividad quitina sintasa hacia la membrana (Cabib *et al.* 2001). La quitina sintasa usa UDP-N-acetilglucosamina como donador, y ésta se sintetiza en el citosol mientras que la quitina se encuentra extracelularmente (Lesage *et al.* 2006). La síntesis de quitina tiene lugar como un proceso transmembranal que sucede de forma vectorial, así, el sustrato se localiza en la parte interna de la membrana plasmática y el producto sale hacia el exterior de la misma donde se localiza finalmente (Cabib *et al.* 1983).

En *S. cerevisiae* se han descrito tres enzimas diferentes con actividad quitina sintasa, la quitina sintasa I (CSI), la quitina sintasa II (CSII) y la quitina sintasa III (CSIII). Están codificadas por los genes *CHS1*, *CHS2* y *CHS3*, y codifican proteínas integrales de membrana de 1.131, 963 y 1.165 residuos respectivamente (Bulawa 1993, Cabib *et al.* 2001, Lesage *et al.* 2006).

CSI está implicada en la reparación de los daños en la pared celular al final de la citoquinesis, contrarrestando el efecto hidrolítico de la endoquitinasa (CTS1) (Cabib *et al.* 2001). La actividad CSI y la síntesis de Chs1p permanecen constantes durante el crecimiento vegetativo, aunque cuando se tratan células de *S. cerevisiae* de tipo sexual *a* con la feromona  $\alpha$ , se induce transitoriamente la expresión de *CHS1*. Chs1p sin embargo, no parece ser la responsable de la síntesis de quitina durante el apareamiento, si bien podría jugar un papel importante, quizá como enzima de reparación durante la lisis de la pared celular, necesaria para la fusión de dos células que se aparean (Valdivieso *et al.* 2000).

CSII se localiza en el cuello entre la célula madre y la gema (Chuang *et al.* 1996) y está implicada en la síntesis del septo primario (Shaw *et al.* 1991, Cabib *et al.* 2001). A diferencia de *CSHI*, que mantiene constante su expresión a lo largo del ciclo celular, la expresión de *CHS2* está regulada, presentando un máximo de expresión durante la septación (Choi *et al.* 1994). Inmediatamente después, Chs2p es transportada a la vacuola donde es degradada (Chuang *et al.* 1996, Cabib *et al.* 2001).

CSIII es la responsable de la síntesis del 90-95% de la quitina de la pared celular. Sintetiza un anillo de quitina en el punto de gemación, marcando la base para la gema incipiente (Shaw *et al.* 1991, Chuang *et al.* 1996). También es responsable de la síntesis de quitina en las paredes laterales, que tiene lugar especialmente en los últimos estadios del ciclo celular (Shaw *et al.* 1991). Los niveles de Chs3 permanecen constantes a lo largo del ciclo celular, sin embargo se encuentra localizada en los lugares de crecimiento polarizado (Choi *et al.* 1994, Chuang *et al.* 1996). Existen otros genes implicados en la síntesis de quitina que son considerados reguladores de la actividad CSIII: *CHS4*, *SHC1*, *CHS5*, *CHS6* y *CHS7*, cuya delección provoca defectos graves de quitina en la pared de las células, y que parecen estar implicados tanto en la localización correcta, como en la exportación de Chs3p desde el retículo endoplasmático a la superficie celular (Cid *et al.* 1995).

### 2.1.3. $\beta$ -1,6-glucano.

El  $\beta$ -1,6-glucano representa en torno al 10% del peso seco de la pared celular, y se encuentra principalmente en la parte externa de la misma. Se trata de residuos de glucosa unidos mediante enlaces  $\beta$ -1,6, que forman un polímero de entre 130 y 350 residuos por molécula (Klis *et al.* 2002, Lesage *et al.* 2006). A diferencia del  $\beta$ -1,3-glucano que presenta una estructura microfibrilar, el  $\beta$ -1,6-glucano forma una estructura amorfa, muy ramificada (Lesage *et al.* 2006). Tiene además un papel relevante en la organización de la pared celular, ya que es la molécula que actúa como unión flexible formando interconexiones con el  $\beta$ -1,3-glucano, con la quitina y con las manoproteínas, enlazando estas últimas con la matriz de  $\beta$ -1,3-glucano (Lesage *et al.* 2006).



Los polisacáridos extracelulares son sintetizados, bien en la ruta secretora (el caso de los N- y O-glicanos), o bien en la superficie celular (el caso del  $\beta$ -1,3-glucano y de la quitina). La síntesis del  $\beta$ -1,6-glucano sin embargo, es un proceso que no está del todo clarificado (Cabib *et al.* 2001, Lesage *et al.* 2006). Hay evidencias de que su síntesis implica procesos en el retículo endoplasmático, en el aparato de Golgi y en la superficie celular. Posiblemente tenga lugar en la superficie celular pero requiera de etapas intracelulares previas (Shahinian *et al.* 2000, Cabib *et al.* 2001). El modo de síntesis tampoco es conocido, no está claro si se sintetiza como una molécula lineal y es posteriormente ramificado o bien si se sintetiza uniendo repetidamente un oligosacárido ramificado a una cadena en crecimiento (Klis *et al.* 2006).

La toxina killer K1 es una pequeña proteína que forma poros en la membrana plasmática causando la muerte celular (Bussey 1991, Klis 1994, Cid *et al.* 1995) y para su actuación, es necesaria la unión previa al  $\beta$ -1,6-glucano (Hutchins *et al.* 1983, Cid *et al.* 1995). El uso de la toxina killer K1 ha supuesto una herramienta muy útil en la identificación de genes implicados en la síntesis del  $\beta$ -1,6-glucano, ya que los mutantes defectivos en su síntesis son resistentes a la misma (Klis 1994, Cid *et al.* 1995).

*KRE5* (de *Killer Resistant*) codifica una proteína localizada en el retículo endoplasmático y su papel en la síntesis del  $\beta$ -1,6-glucano podría ser indirecto (Meaden *et al.* 1990, Levinson *et al.* 2002, Lesage *et al.* 2006).

*KRE6* codifica una glicoproteína de membrana de tipo II (Roemer *et al.* 1991, Cid *et al.* 1995) localizada en el aparato de Golgi (Roemer *et al.* 1994, Cid *et al.* 1995). Su estructura es similar a algunas glucosil hidrolasas o transglucosilasas, lo que podría indicar su función en algún paso de procesamiento de glucosa. Las posibilidades incluyen el procesamiento de un precursor o aceptor para la síntesis del  $\beta$ -1,6-glucano o el procesamiento de una glicoproteína asociada a la  $\beta$ -1,6-glucano sintasa (Montijn *et al.* 1999, Lesage *et al.* 2006).

*KRE1* codifica una proteína rica en serina/treonina, que podría actuar uniendo una cadena lineal de  $\beta$ -1,6-glucano a un glucano receptor altamente ramificado (Boone *et al.* 1990, Lesage *et al.* 2006).

*KRE9* codifica una O-glicosidasa de la superficie celular. Kre9p podría actuar anclando en la pared celular una molécula recién sintetizada de  $\beta$ -1,6-glucano, o como componente extracelular de una  $\beta$ -1,6-glucano sintasa (Dijkgraaf *et al.* 1996, Lesage *et al.* 2006).

### 2.1.4. Manoproteínas.

Las manoproteínas representan el 35-40% del peso seco de la pared celular y se encuentran principalmente formando parte de la capa externa. Su función puede ser de varios tipos. La mayor parte actúa como componentes estructurales de la pared, siendo responsables de la permeabilidad de la misma (Cid *et al.* 1995). Entre estas manoproteínas se encuentran las codificadas por los genes *DAN/TIR* y también *CWP1* y *CWP2* (Abramova *et al.* 2001, Lesage *et al.* 2006). Otras manoproteínas se encuentran localizadas en la pared celular o en el espacio periplasmático y son enzimas que llevan a cabo funciones tróficas o morfogenéticas. Enzimas como la invertasa o la fosfatasa ácida cumplirían con este papel (Cid *et al.* 1995). Por último, algunas manoproteínas de la pared presentan funciones específicas, como la  $\alpha$ -aglutinina, implicada en la adhesión célula-célula (Lipke *et al.* 1992, Lesage *et al.* 2006), y las proteínas Flo o floculinas, implicadas en la floculación y en el crecimiento invasivo (Verstrepen *et al.* 2003, Lesage *et al.* 2006).

Las manoproteínas son glicoproteínas compuestas en un 30% por proteína y en un 70% por polisacárido, del que un 98% corresponde a manosa y un 2% a glucosa (Waters *et al.* 1994). En la parte proteica destaca la abundancia de aminoácidos como la serina, la treonina, y la asparragina (Klis 1994). La síntesis de las manoproteínas tiene lugar, como otras proteínas cuyo destino es el espacio extracelular, en el retículo endoplasmático, siguiendo posteriormente la ruta secretora. La unión de residuos de manosa a las proteínas está mediada por O-glicosilación o N-glicosilación, pudiendo encontrarse ambas simultáneamente en la misma molécula de proteína (Kukuruzinska *et al.* 1987, Tanner *et al.* 1987, Cid *et al.* 1995).

Los oligosacáridos O-manosilados consisten en cadenas cortas de hasta 5 unidades de manosa en las que los dos primeros residuos están unidos mediante un enlace  $\alpha$ -1,2 y los siguientes mediante enlaces  $\alpha$ -1,3. La unión de estas cadenas al esqueleto proteico tiene lugar en los residuos de serina/treonina. A pesar del pequeño tamaño de las cadenas O-manosiladas, muchas proteínas tienen regiones ricas en serina/treonina organizadas en *clusters*, de modo que el número de estas cadenas por proteína puede ser elevado y la cantidad de manano unido, muy significativa (Strahl-Bolsinger *et al.* 1999, Lesage *et al.* 2006). El paso inicial para la O-manosilación tiene lugar en el retículo endoplasmático, donde una molécula de manosa es transferida a un residuo de serina/treonina, a partir de un precursor de manosa-dolicil-fosfato (Burda *et al.* 1999, Strahl-Bolsinger *et al.* 1999, Lesage *et al.* 2006).

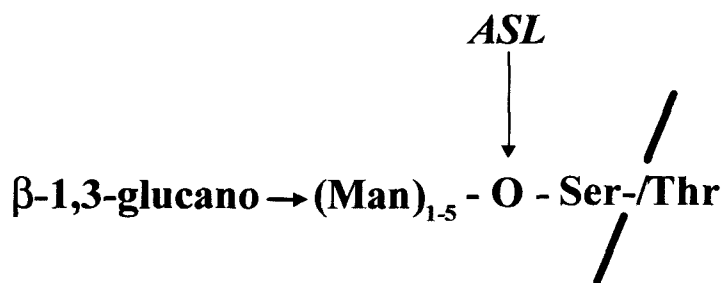
En la N-manosilación, las cadenas de manano están unidas a residuos de asparragina y contienen una estructura principal de entre 8 y 15 residuos de manosa. La adquisición de este oligosacárido tiene lugar en el retículo endoplasmático mientras que en el Golgi se produce su manosilación extensiva. Unida a las proteínas se encuentra una cadena principal de hasta 50 residuos de manosa unidos por enlaces  $\alpha$ -1,6 en la que hay unidas pequeñas cadenas de residuos  $\alpha$ -1,2 que terminan en manosas  $\alpha$ -1,3. El resultado es una estructura altamente ramificada de hasta 200 residuos de manosa (Dean 1999, Lesage *et al.* 2006)

La capa de manoproteínas de la parte externa de la pared es mucho menos permeable a las macromoléculas que la capa de  $\beta$ -1,3-glucano interna. Esto se debe principalmente a la presencia de cadenas laterales de manano altamente ramificadas, y a la presencia de puentes disulfuro (Klis *et al.* 2002). Las cadenas laterales de polisacáridos contienen abundantes enlaces fosfodiéster, dando lugar a numerosas cargas negativas en la superficie de la pared en un pH fisiológico. Estas cadenas laterales son las responsables de las propiedades hidrofílicas de la pared y podrían estar involucradas en la retención de agua y en la protección frente a la desecación (Klis *et al.* 2002)

La mayor parte de las proteínas de la pared están ancladas covalentemente al  $\beta$ -1,3-glucano, de manera directa o a través de un fragmento de  $\beta$ -1,6-glucano. En algunos

casos sin embargo, pueden estar unidas mediante puentes disulfuro o interacciones no covalentes (Klis *et al.* 2002). Las manoproteínas unidas covalentemente pueden dividirse en dos tipos, proteínas Pir y proteínas con anclaje GPI.

Las proteínas Pir (de *Protein with internal repeats*), son constituyentes de la capa interna de la pared celular y están unidas al  $\beta$ -1,3-glucano directamente mediante un enlace *ASL* (de *Alkali-Sensitive Linkage*, sensible a la hidrólisis por un álcali) (figura 1) (Klis *et al.* 2002).

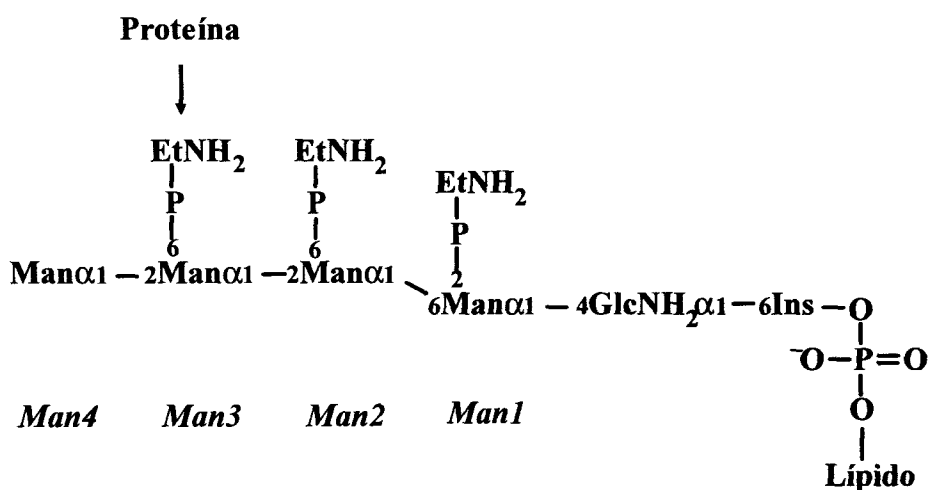


**Figura 1:** Esquema de la unión de las proteínas Pir al  $\beta$ -1,3-glucano. *ASL*: enlace sensible a un álcali. Man: manosa. Ser: serina. Thr: treonina.

Las proteínas Pir más abundantes son Pir1p/Ccw6p, Hsp150p/Pir2p/Ccw7p, Pir3p/Ccw8p, y Cis3p/Pir4p/Ccw5p (Lesage *et al.* 2006). Estas proteínas están estructuralmente relacionadas y contienen regiones ricas en serina/treonina, por lo que se piensa que están altamente O-manosiladas. Están compuestas por un péptido señal N-terminal, un punto de corte por la endoproteasa *Kex2p*, una región con hasta 11 repeticiones internas y una región C-terminal muy conservada que contiene numerosos residuos de cisteína (Gentzsch *et al.* 1997, Lesage *et al.* 2006). Se piensa que las repeticiones internas están implicadas en la conexión con el  $\beta$ -1,3-glucano (Castillo *et al.* 2003, Lesage *et al.* 2006), aunque actualmente no se conoce la identidad ni la enzima que cataliza la reacción de unión de estas dos moléculas (Lesage *et al.* 2006). Los genes *PIR* presentan una expresión dependiente de la fase del ciclo celular, así *CIS3* tiene un pico de expresión en  $G_2$  mientras que *PIR1*, *HSP150* y *PIR3* lo presentan en  $G_1$  (Spellman *et al.* 1998, Lesage *et al.* 2006). Su expresión también es inducida por la exposición a calcofluor white o a zimoliasa, indicando que pertenecen a un grupo de genes de respuesta a perturbaciones en la pared celular (Boorsma *et al.* 2004, Lesage *et al.* 2006). Las proteínas Pir parecen tener además un papel de proteínas de barrera, influenciando la permeabilidad de la pared celular (Lesage *et al.* 2006).

Las proteínas dependientes de GPI (glicosilfosfatidilinositol) son constituyentes de la capa externa de la pared celular y están generalmente unidas al  $\beta$ -1,3-glucano mediante un puente de  $\beta$ -1,6-glucano. Tienen tres características comunes: una secuencia señal en el extremo N-terminal, una región rica en serinas y treoninas, y una señal de anclaje a GPI en el extremo C-terminal. Esta señal consta de un dominio hidrofóbico con un tamaño mínimo de 12 aminoácidos, separados del sitio de unión de la molécula GPI (denominado aminoácido ?) por un tramo corto de aminoácidos más polares (Kapteyn *et al.* 1999).

El anclaje GPI (figura 2) es una estructura común a muchos eucariotas que permite la unión covalente de proteínas a la membrana plasmática y también a la pared celular en hongos.

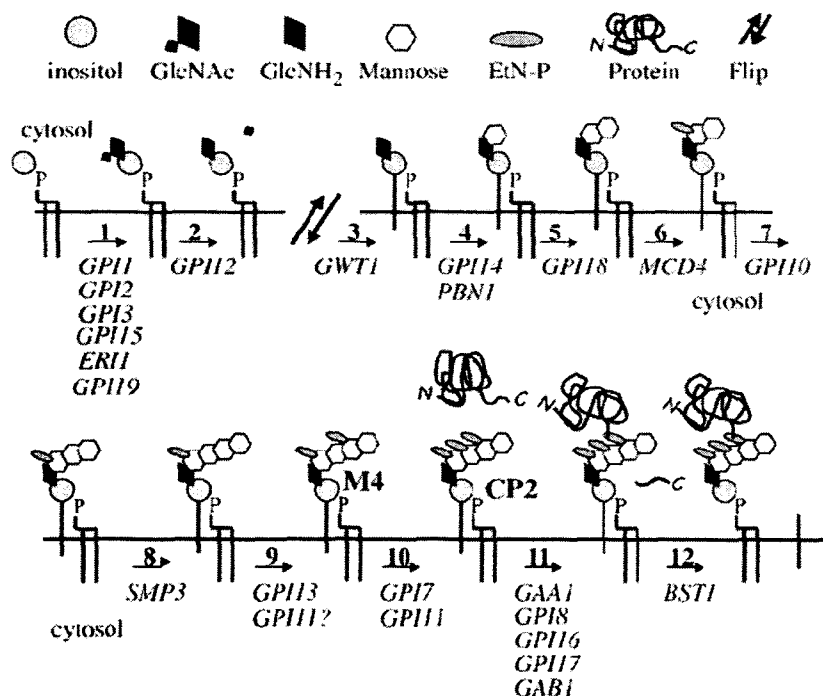


**Figura 2:** Estructura del anclaje GPI. Man: manosa, EtNH<sub>2</sub>: etanolamina, GlcNH<sub>2</sub>: N-acetil glucosamina, Ins: Inositol. Los números indican el átomo de C del monosacárido implicado en la formación del enlace. *Man1*, *Man2*, *Man3* y *Man4*, hacen referencia a la primera, segunda, tercera y cuarta manosa del anclaje GPI respectivamente (Pittet *et al.* 2007).

La parte central de esta estructura está conservada desde las levaduras a los mamíferos y consiste en una secuencia lineal de un residuo de fosfatidilinositol, uno de glucosamina y tres de manosa. La unión covalente a la membrana se consigue mediante un enlace fosfodiéster entre el residuo de inositol y un lípido de la membrana. Además existen ramificaciones en forma de fosfatidiletanolamina, y de ellas el residuo de

fosfatidiletanolamina sobre la tercera manosa es el que sirve para formar el enlace con la proteína. En el caso de *S. cerevisiae* existe una cuarta manosa y ramificaciones adicionales de fosfatidiletanolamina en los dos primeros residuos de manosa (Richard *et al.* 2002).

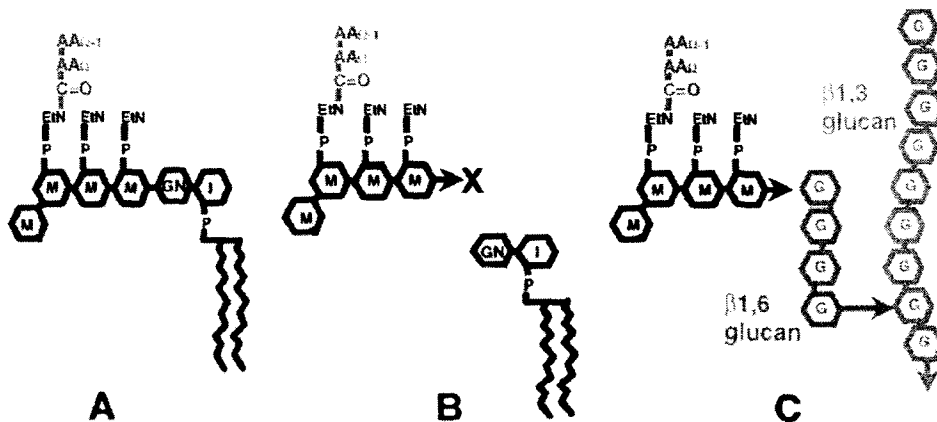
La síntesis del anclaje GPI y su unión a las proteínas es un proceso complejo que implica la acción de numerosas enzimas (figura 3). La mayoría de los genes involucrados en la biosíntesis del anclaje GPI son esenciales en *S. cerevisiae* y en los casos en los que se disponen de mutantes condicionales, las condiciones restrictivas suponen prácticamente una completa reducción de la biosíntesis de las proteínas de la pared, así como de alteraciones en el retículo endoplasmático (Vossen *et al.* 1997, Pittet *et al.* 2007). *GPI7* es, junto con *ERI1*, el único gen no esencial implicado en el proceso de síntesis del anclaje GPI y codifica una proteína responsable de la adición de un residuo de fosfoetanolamina a la segunda manosa (Benachour *et al.* 1999, Richard *et al.* 2002).



**Figura 3:** síntesis del anclaje GPI y su unión a proteína. Los números sobre las flechas indican el orden de la reacción en la síntesis del anclaje. En cada reacción se nombran los genes que codifican las enzimas implicadas en ella. (Pittet *et al.* 2007).

La incorporación del anclaje GPI a las manoproteínas tiene lugar en el retículo endoplasmático, donde son sintetizadas gracias a su secuencia señal en posición N-terminal, que es eliminada durante el proceso de entrada. La señal para la adición del anclaje GPI se encuentra en el extremo C-terminal de la proproteína, en forma de un conjunto de aminoácidos hidrofóbicos que la mantienen transitoriamente unida a la membrana. Finalmente esta secuencia señal es reemplazada, mediante un proceso de transamidación, por el anclaje GPI previamente sintetizado (Fraering *et al.* 2001).

La glicosilación de las manoproteínas se produce también en el retículo endoplasmático, mediante los mecanismos de glicosilación comunes a la mayor parte de las proteínas glicosiladas. En el caso de las levaduras, las manoproteínas de la capa externa de la pared celular son generalmente sintetizadas como un precursor con anclaje GPI, unido primero a la membrana de las vesículas secretoras y después a la membrana plasmática. Posteriormente la proteína es liberada de la membrana y unida a la capa de  $\beta$ -1,3-glucano, generalmente a través de un intermediario de  $\beta$ -1,6-glucano (Lu *et al.* 1995). En este último caso las proteínas no contienen la molécula GPI entera sino lo que se ha denominado “GPI remanente” sin la parte lipídica, que es el resultado del procesamiento de la molécula GPI liberada de la membrana plasmática y unida al  $\beta$ -1,6-glucano (figura 4).



**Figura 4:** Unión de una proteína con anclaje GPI a la pared celular mediante su unión al  $\beta$ -1,6-glucano. (A) Proteína con anclaje GPI: AA: residuo de amino ácido, EtN: etanolamina, P: fosfato, M: manosa, GN: N-acetil glucosamina, I: inositol. Unido al inositol se encuentra un fosfolípido que puede tener una base de glicerol o de esfingosina. (B) Escisión del anclaje GPI que mantiene la proteína unida a la membrana a través del residuo lipídico. La flecha indica el extremo reductor del oligomano y la "X" indica un hipotético complejo proteico u otro "activador" (C) Formación del enlace glicosídico entre el GPI remanente de la proteína y el  $\beta$ -1,6-glucano. G: glucosa (Lipke *et al.* 1998)

## 2.2. Regulación de la composición y estructura de la pared celular.

Como se ha comentado anteriormente, la pared celular no es una estructura estática, su naturaleza es dinámica y su composición y arquitectura pueden variar ampliamente en respuesta a diferentes factores.

### 2.2.1. Factores ambientales y del crecimiento.

Determinados parámetros inherentes a las condiciones de crecimiento, tales como el modo de cultivo (en *batch* o en fermentador), la composición del medio, la concentración de O<sub>2</sub> disponible, la naturaleza de la fuente de carbono, el pH o la temperatura, pueden influir sobre la composición de la pared celular (Aguilar-Uscanga *et al.* 2003). El ciclo celular y la fase de crecimiento también son factores determinantes de la estructura de la pared. Los cambios en la misma, en respuesta a estos factores pueden producirse a diferentes niveles. Los factores ambientales pueden determinar el peso seco de la pared respecto a la célula, la composición de polisacáridos de la misma, así como la expresión de genes que codifican manoproteínas estructurales (Abramova *et al.* 2001, Aguilar-Uscanga *et al.* 2003)

Un ejemplo de cómo los factores ambientales determinan la expresión de genes que codifican diferentes manoproteínas, se observa en condiciones de aerobiosis o anaerobiosis (Abramova *et al.* 2001). *CWP1* y *CWP2* codifican dos de las proteínas mayoritarias de la pared celular y están implicadas en su estabilización (Shimoi *et al.* 1995, van der Vaart *et al.* 1995, Abramova *et al.* 2001). La expresión de estos dos genes, en condiciones de crecimiento normales, se produce en aerobiosis (Abramova *et al.* 2001). Al pasar las células de un ambiente aeróbico a un ambiente anaeróbico, se reprime fuertemente la expresión de *CWP1* y *CWP2*, mientras que se induce la expresión de genes de la familia *DAN/TIR*, que incluye *DAN1*, *DAN2*, *DAN3*, *DAN4*, *TIR1*, *TIR2*, *TIR3*, *TIR4* y *TIP1*. La substitución de Cwp1p y Cwp2p por proteínas Dan/Tir indica una remodelación programada de la pared. Esta substitución es además un hecho importante para la adaptación a las condiciones anaeróbicas, ya que los genes *TIR1*, *TIR2* y *TIR4* son esenciales para el crecimiento en estas condiciones. Un proceso de substitución análogo ocurre ante el choque térmico frío, la expresión de los genes *TIP1*, *TIR1*, *TIR2* y *TIR4* se ve inducida mientras que la de *CWP1* se ve reprimida.



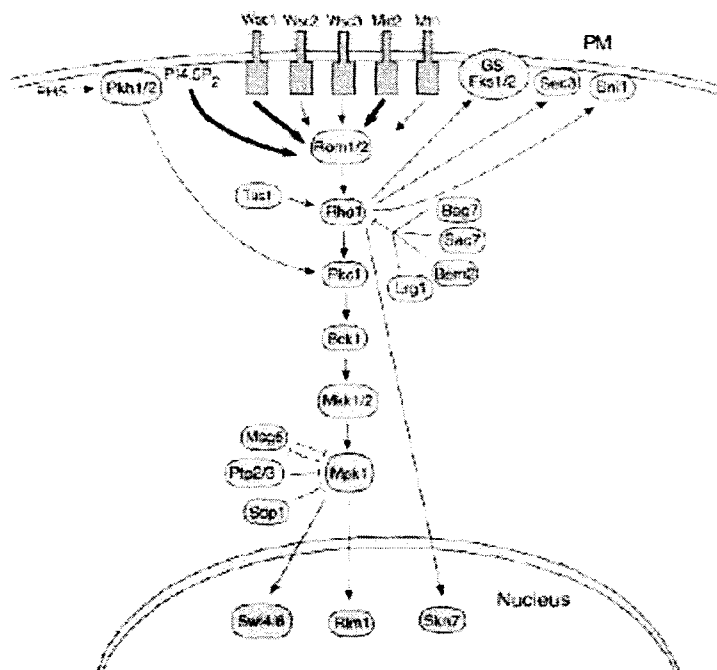
Durante el crecimiento en fase exponencial, la composición de la pared celular es diferente que una vez entrada la fase estacionaria (Klis *et al.* 2002). En estas condiciones la manoproteína más abundante en la pared es Sed1p y los niveles de transcripción de *SP11*, que codifica una manoproteína dependiente de GPI, aumentan también notablemente (Puig *et al.* 2000, Klis *et al.* 2002). La pared se vuelve más gruesa, más resistente a la digestión por  $\beta$ -1,3-glucanasas y menos permeable a las macromoléculas (de Nobel *et al.* 1990, Klis *et al.* 2002). No obstante, el aumento de la resistencia de la pared se debe principalmente a un aumento en el grosor de la misma, y no a un aumento en las interconexiones entre sus diferentes componentes (Smith *et al.* 2000, Klis *et al.* 2002).

A lo largo del ciclo celular también se produce una regulación de la estructura y síntesis de la pared celular. Como ya se ha comentado en apartados anteriores, la síntesis de quitina es un proceso regulado tanto espacial, como temporalmente. Los niveles de Csh3p, la quitina sintasa responsable de la síntesis del 90% de la quitina de la pared, permanecen constantes a lo largo del ciclo celular. Su localización sin embargo, no se da homogéneamente a lo largo de toda la pared, sino que se encuentra localizada en los lugares de crecimiento polarizado (Choi *et al.* 1994, Chuang *et al.* 1996). Csh1p también mantiene sus niveles constantes a lo largo del ciclo celular pero a diferencia de Csh3p, sí se encuentra uniformemente distribuida en la membrana plasmática (Cid *et al.* 1995). Su expresión sin embargo, puede verse inducida transitoriamente por efecto de la feromona  $\alpha$ . Por último, la expresión de *CHS2* está regulada a lo largo del ciclo celular, presentando un máximo de expresión durante la septación (Choi *et al.* 1994).

### 2.2.2. Condiciones de estrés.

En *S. cerevisiae*, existe una ruta de integridad de la pared celular denominada CWI (de Cell Wall Integrity) que se activa bajo diferentes condiciones que implican estrés en su estructura (Levin 2005). La ruta está compuesta por una familia de receptores en la superficie celular, asociada a una pequeña proteína G denominada Rho1p, que activa una serie de efectores (figura 5). Estos efectores regulan procesos que incluyen la síntesis de  $\beta$ -glucano en el punto de remodelación de la pared, la expresión

de genes relacionados con su biogénesis, la organización del citoesqueleto de actina y la dirección de las vesículas de secreción a los lugares de crecimiento de la pared.



**Figura 5:** Esquema de la ruta CWI (Levin 2005).

La señal es iniciada en la membrana plasmática a través de los receptores Wsc1p, Wsc1p, Wsc3p, Mid2p y Mtl1p. Estos receptores, a través de PI4, 5P2 y el factor de intercambio de nucleótidos de guanina Rom1/2p, activan Rho1p, que pasa de la forma inactiva unida a GDP, a la forma activa unida a GTP. Rho1p activa cinco efectores, que incluyen la β-1,3-glucano sintasa, la proteína de la familia de las forminas Bni1p, Sec3p, el factor de transcripción Skn7p y la proteína quinasa Pkc1p.

En levaduras, la cascada MAP quinasa Pkc1p/Mpk1p (de Mitogen Activated Protein) es la principal ruta de transducción de señales necesaria para la construcción correcta de la pared. Está compuesta de cuatro proteína quinasas: Pkc1p da comienzo a la cascada al fosforilar (y por tanto activar) la proteína quinasa Bck1p. Bckp1 fosforila a Mkk1/2p que a su vez fosforila a Mpk1p (Heinisch *et al.* 1999, Levin *et al.* 2005). La proteína Mpk1p activa, entra en el núcleo donde se une a los factores de transcripción Rlm1p y al complejo SBF, mediante la intervención de la proteína Knr4p (Martin-Yken *et al.* 2003). Rlm1p y el complejo SBF inducen la expresión de genes implicados en la remodelación de la pared celular (Levin 2005).

El factor de transcripción Rlm1p es el responsable de la mayor parte de la respuesta transcripcional en la ruta CWI. Rlm1p regula la expresión de al menos 25 genes, la mayoría de los cuales codifican manoproteínas de la pared celular o están de alguna otra manera implicados en su biogénesis (Jung *et al.* 1999, Levin *et al.* 2005). Esta regulación puede ser tanto positiva como negativa, indicando que Rlm1p puede actuar como activador o represor transcripcional en función del contexto.

El complejo SBF es un factor transcripcional compuesto de una subunidad reguladora, Swi6p y una subunidad de unión al DNA, Swi4p. Su función principal es la de regular la transición de la fase G<sub>1</sub> a la fase S en el ciclo celular, mediante la expresión de genes que codifican ciclinas G<sub>1</sub>. También está implicado en la regulación de la expresión de genes implicados en la biosíntesis de la pared en respuesta a estrés (Levin *et al.* 2005).

Los factores que inducen la activación de la ruta CWI pueden ser de diversa naturaleza, como agentes químicos, agentes físicos o incluso mutaciones en determinados genes. Es importante subrayar que la respuesta que se produce mediante la activación de la ruta CWI es en la mayoría de los casos la misma, independientemente del factor causante el daño celular. El resultado de esta respuesta es que las células no solo se vuelven más resistentes a glucanasas u otros agentes desestabilizadores de la pared, sino que también lo hacen frente al estrés térmico. Este mismo fortalecimiento de la pared es importante para la tolerancia de distintas formas de estrés (de Nobel *et al.* 2000, Smits *et al.* 2001). La respuesta se puede resumir en tres procesos fundamentales (Smits *et al.* 2001):

1. *Se aumenta la síntesis de varios componentes de la pared.* La síntesis del  $\beta$ -1,3-glucano se ve inducida por medio de la expresión del gen *FKS2* (que codifica una subunidad de la  $\beta$ -1,3-glucano sintasa). La síntesis de quitina también se ve drásticamente aumentada pudiendo pasar de niveles normales del 1-2% a concentraciones superiores al 20%. La transcripción de varias manoproteínas de la pared celular se ve inducida, probablemente para disminuir la permeabilidad de la pared y proteger la matriz de  $\beta$ -glucano frente a enzimas líticas.

2. *La célula utiliza mecanismos alternativos para la incorporación de manoproteínas a la pared celular.* En condiciones normales, la mayor parte de las manoproteínas con anclaje GPI están unidas al  $\beta$ -1,3-glucano mediante una cadena de  $\beta$ -1,6-glucano (Klis *et al.* 2002). Cuando la cantidad de  $\beta$ -1,3-glucano de la pared se ve disminuida, estas manoproteínas se unen a la quitina mediante una cadena de  $\beta$ -1,6-glucano, algo consistente con la mayor disponibilidad de quitina. Si lo que se ve disminuido es el  $\beta$ -1,6-glucano, aumenta el número de manoproteínas unidas directamente al  $\beta$ -1,3-glucano y a la quitina, probablemente por el aumento en los niveles de expresión de las proteínas Pir.

3. *For talecimiento de toda la pared independientemente del punto en el que se haya producido el daño.* Mientras en condiciones normales el citoesqueleto de actina, la protein kinasa Pkc1p y la  $\beta$ -1,3-glucano sintasa se localizan en las regiones de crecimiento polarizado, ante situaciones de estrés se produce una redistribución a lo largo de toda la célula. Esta redistribución es transitoria y transcurrido un espacio breve de tiempo se produce su repolarización. Csh1p y/o Chs3p, las quitina sintasas que funcionan respectivamente en la reparación de la pared celular y en la síntesis de quitina en la pared lateral, también pueden ser redistribuidas.

Entre los agentes químicos que inducen la CWI se encuentran el calcofluor white, el rojo Congo, el ácido tánico, la cafeína o la digestión con zimoliasa (Levin 2005). El calcofluor white es un compuesto que se une a las cadenas crecientes de quitina, evitando su cristalización y la formación de microfibrillas (Elorza *et al.* 1983, Ram *et al.* 1994). En presencia de este agente, se forma un septo anormalmente grueso y la separación entre la célula madre y la hija es incompleta, dando lugar a agregados multicelulares (Roncero *et al.* 1988, Ram *et al.* 1994). El rojo Congo actúa de manera similar al calcofluor white pero impidiendo en este caso la correcta formación de cadenas de  $\beta$ -1,3-glucano (Kopecka *et al.* 1992, Ram *et al.* 1994).

Entre los factores físicos encontramos el estrés térmico (crecimiento a 37° o 39°C), el estrés hipo-osmótico, el estrés oxidativo, o el estiramiento de la membrana plasmática (Levin 2005).

Además de las condiciones físicas y químicas mencionadas como causantes de estrés en la pared celular, hay situaciones a lo largo del ciclo celular en las que de manera natural las células experimentan estrés en la pared. Durante el crecimiento polarizado, las células son más vulnerables a la lisis a causa del estrés que experimentan en la pared, y en esta situación la ruta CWI también se ve activada (Levin 2005).

### **2.3. Mutantes de delección en genes implicados en la síntesis o remodelación de la pared.**

El uso de mutantes delecionados en un gen es una herramienta muy utilizada para estudiar las funciones de su producto génico, y éste es el modo en el que se han determinado las funciones de varios genes implicados en la síntesis y/o remodelación de la pared celular. Estos genes pueden clasificarse en tres grupos diferentes dependiendo de las funciones de las proteínas que codifican: genes implicados en la síntesis de macromoléculas de la pared, genes implicados en la remodelación o interconexión de los polímeros de la pared, y por último genes implicados en la regulación de la construcción de la pared (Klis *et al.* 2002). La delección de estos genes da como resultado una composición alterada de la pared y en gran parte de los casos, se activa el mecanismo compensatorio para garantizar la estabilidad celular mediado por la ruta CWI (Levin 2005).

Como se ha comentado anteriormente, el mecanismo compensatorio frente a estrés en la pared celular es un proceso común a diferentes agentes desestabilizadores. Sin embargo, esto no es posible cuando la síntesis de algunos de sus componentes está impedida, dando lugar a resultados distintos. Así, ante defectos en la síntesis del  $\beta$ -1,3-glucano, se encuentra más quitina en las paredes laterales y una mayor cantidad de manoproteínas con anclaje GPI unidas a  $\beta$ -1,6-glucano y a quitina. Defectos en la síntesis del  $\beta$ -1,6-glucano por el contrario, dan lugar a una mayor presencia en el medio de manoproteínas dependientes de anclaje GPI, así como una mayor concentración en la

pared de proteínas Pir, de  $\beta$ -1,3-glucano y de quitina. Además, también puede que aumenten las uniones entre proteínas con anclaje GPI y el  $\beta$ -1,3-glucano a través de enlaces sensibles a álcali. Por último, defectos en la N- u O-glicosilación tiene como resultado paredes laterales con una mayor concentración de quitina (Klis *et al.* 2002).

### 2.3.1. Genes implicados en la síntesis del $\beta$ -1,3-glucano.

La interrupción de *FKS1* (que codifica la subunidad catalítica de la  $\beta$ -1,3-glucano sintasa) da lugar a una importante reducción en la síntesis del  $\beta$ -1,3-glucano y a un fenotipo de crecimiento lento (Douglas *et al.* 1994). La síntesis del  $\beta$ -1,3-glucano y por tanto su concentración en la pared, se ven reducidas pero no completamente anuladas, indicando que existe una actividad  $\beta$ -1,3-glucano sintasa residual en estos mutantes. Esta síntesis es llevada a cabo por Fks2p, la subunidad de la  $\beta$ -1,3-glucano sintasa expresada en ausencia de glucosa (Mazur *et al.* 1995), que ve inducida su expresión ante la interrupción de *FKS1*. Fks2p puede restituir completamente el fenotipo silvestre cuando se expresa a niveles suficientemente elevados. Sus niveles de expresión sin embargo son muy bajos en los mutantes defectivos en *FKS1*, hecho que explica su crecimiento más lento (Mazur *et al.* 1995, Terashima *et al.* 2000). *EXG1*, que codifica la  $\beta$ -1,3-exoglucanasa (Vasquez de Aldana *et al.* 1991, Cappellaro *et al.* 1998) también ve aumentada su expresión en mutantes defectivos en *FKS1* (Lagorce *et al.* 2003), indicando una remodelación de la matriz de  $\beta$ -1,3-glucano.

La interrupción de *FKS1*, además de la inducción de genes implicados en la síntesis y remodelación del  $\beta$ -1,3-glucano, también da lugar a otros mecanismos para compensar el debilitamiento de la pared como consecuencia de la síntesis deficiente de  $\beta$ -1,3-glucano. En estos mutantes se encuentra inducida la transcripción de 22 genes, 3 de los cuales codifican proteínas de anclaje GPI unidas a la pared celular (Terashima *et al.* 2000). Estos genes son *CWPI* (expresado de manera natural en condiciones aeróbicas), *YLR194c* y *PST1*, y su expresión estaría implicada en disminuir la permeabilidad de la pared protegiendo la matriz de  $\beta$ -glucano frente a las glucanasas. Como se ha comentado anteriormente, una respuesta general ante el estrés en la pared celular es el aumento en la proporción de quitina en la misma. García-Rodríguez *et al.* (2000) demostraron que en los mutantes defectivos en *FKS1*, se produce un gran

aumento en la actividad CSIII como consecuencia de la inducción de la expresión de *CHS3*, unida a una deslocalización de la misma. La expresión de *CRHI*, que codifica una proteína de la pared implicada en la transferencia de quitina al  $\beta$ -1,6-glucano, también se ve inducida (Terashima *et al.* 2000), de modo que no solo la cantidad de quitina en la pared aumenta, sino también sus interconexiones con el  $\beta$ -1,6-glucano unido a manoproteínas.

La delección de otros genes implicados al igual que *FKS1* en la síntesis del  $\beta$ -1,3-glucano, da lugar a un fenotipo muy similar al de las cepas defectivas en este gen (García-Rodríguez *et al.* 2000, Terashima *et al.* 2000, Dijkgraaf *et al.* 2002, Lagorce *et al.* 2003). De este modo, la ausencia de Gas1p da lugar a un aumento de un 40% en el contenido de manano, a 5 veces más quitina y a una reducción de un 30% en el contenido en  $\beta$ -glucano (Popolo *et al.* 1997, Ram *et al.* 1998). Estos mutantes presentan una morfología más esférica, crecen más lentamente y liberan al medio  $\beta$ -1,3-glucano y manoproteínas unidas al  $\beta$ -1,6-glucano (Ram *et al.* 1998). Las manoproteínas con anclaje GPI, en lugar de estar unidas al  $\beta$ -1,3-glucano, se encuentra unidas a quitina mediante una cadena de  $\beta$ -1,6-glucano (Dijkgraaf *et al.* 2002), siendo coherente aumento de la expresión de *CRHI* (Lagorce *et al.* 2003). El aumento en la expresión del gen *CSH3* es probablemente responsable del aumento en quitina de la pared. La expresión de *FKS2* y *EXG1* también se ve aumentada, así como la de los genes que codifican las manoproteínas con anclaje GPI *CWP1*, *YLR194c* y *PST1* (Lagorce *et al.* 2003).

### 2.3.2. Genes implicados en la regulación de la síntesis de la pared.

*KNR4* (de Killer Nine Resistant, también denominado *SMII*) codifica una proteína implicada en la ruta CWI necesaria para la correcta interacción de la MAP quinasa Mpk1p con los factores transcripcionales Rlm1p y Swi4p (Martin-Yken *et al.* 2003), y está implicada en la coordinación de la síntesis de la pared celular en la gemación (Basmaji *et al.* 2006). *KNR4* fue inicialmente aislado por Hong *et al.* (1994a) en un estudio de mutaciones que afectan a la biosíntesis del  $\beta$ -1,3-glucano. El criterio de selección fue la resistencia a la toxina killer K9, una toxina que inhibe la biosíntesis del  $\beta$ -1,3-glucano (Yamamoto *et al.* 1986, 1988). En otro estudio, se observó que copias

adicionales de *KNR4* podían suprimir la hipersensibilidad al calcofluor white de varios mutantes *cwh* (calcofluor white hypersensitive) (Martin *et al.* 1999). La delección de *KNR4* da lugar a un contenido en quitina de la pared 4 veces superior al de la cepa silvestre, mientras que los niveles de  $\beta$ -glucano se reducen un 50% (Hong *et al.* 1994b). Estos mutantes también son hipersensibles a cafeína, a SDS, a Rojo Congo, calcofluor white, caspofungina, cercosporamida, y presentan un crecimiento dificultado a temperaturas superiores a 37°C con gemas de pequeño tamaño (Fishel *et al.* 1993, Martin *et al.* 1999, Hong *et al.* 1994b, Markovich *et al.* 2004). Muchos de los genes que ven aumentada su expresión en mutantes  $\Delta fks1$  y  $\Delta gas1$ , también la ven aumentada en cepas defectivas en *KNR4*. De entre ellos caben destacar *CHS3* (implicado en la síntesis de quitina), *CRH1* (implicado en la unión entre la quitina y el  $\beta$ -1,6-glucano), *FKS2* (subunidad de la  $\beta$ -1,3-glucano sintasa), *EXG1* ( $\beta$ -1,3-exoglucanasa), y las manoproteínas estructurales de la pared *CWP1*, YLR194c y *PST1* (Lagorce *et al.* 2006).

### 2.3.3. Genes implicados en la síntesis del anclaje GPI.

El anclaje GPI es una estructura importante en la estabilidad de la pared celular, y prueba de ello es que la delección de la mayoría de los genes implicados directa o indirectamente en su síntesis es letal (Pittet *et al.* 2007). El residuo de etanolamina de la tercera manosa es lógicamente imprescindible para la viabilidad celular, dado que la unión a la proteína se realiza a través de él (Pittet *et al.* 2007). El de la primera manosa, también es imprescindible al ser un pre-requisito para la unión de fosfoetanolamina en la tercera (Imhof *et al.* 2004). Además, es necesario para un reconocimiento eficiente de los lípidos GPI y las manoproteínas GPI por la enzima GPI transamidasa, para un transporte eficiente desde el retículo endoplasmático al aparato de Golgi (Zhu *et al.* 2006). *GPI7*, que codifica una proteína que cataliza la adición de un residuo de fosfoetanolamina a la segunda manosa del anclaje GPI, no es un gen esencial (Benachour *et al.* 1999, Richard *et al.* 2002). De este modo, en los mutantes defectivos en *GPI7*, el anclaje GPI carente de la fosfoetanolamina de la segunda manosa puede ser unido a proteínas y ser transportadas hasta la superficie celular (Pittet *et al.* 2007). Sin embargo, los mutantes delecionados en *GPI7* muestran diversas alteraciones en la integridad de la pared celular. Son hipersensibles al calcofluor white, lo que indica fragilidad en la pared (Benachour *et al.* 1999), y presentan defectos en la separación de



la célula madre y la hija (Fujita *et al.* 2004). En estos mutantes no se produce la acumulación de productos intermediarios en la biosíntesis de las proteínas de anclaje GPI, pero sí defectos en el transporte. Algunas proteínas con anclaje GPI localizadas en la membrana plasmática como Gas1p, ven muy ralentizado su transporte a través del retículo endoplasmático y el Golgi (Pittet *et al.* 2007). Además, proteínas con anclaje GPI naturalmente localizadas en la membrana, se encuentran unidas al  $\beta$ -glucano de la pared celular, mientras que otras proteínas típicas de la pared son liberadas al medio como consecuencia de un anclaje defectivo (Richard *et al.* 2002). La imposibilidad de retener unidas a la pared celular estas proteínas, que son liberadas al medio, indica que la fosfoetanolamina de la segunda manosa está en cierto modo involucrada en la unión a otros componentes de la pared celular (Richard *et al.* 2002). Esta disminución en manoproteínas unidas a la pared es compensada con un aumento de quitina en la misma (Richard *et al.* 2002), un mecanismo general de fortalecimiento de la pared observado también en respuesta a otras alteraciones.

#### 2.3.4. Otros genes.

En otros estudios realizados con mutantes de delección, identificaron y clasificaron varios genes implicados en la síntesis y regulación de la pared celular en *S. cerevisiae*. En muchos de los casos, su delección dio lugar a fenotipos similares a los ya observados para otros mutantes, incluida la liberación al medio de manoproteínas de la pared. Algunos de los genes estudiados se describen a continuación:

- YPL133c  $\Rightarrow$  Codifica un factor transcripcional y se ha observado que la pared de los mutantes de *Candida albicans* defectivos en este gen, presenta una proporción de manano cinco veces superior a la de la cepa silvestre (Moreno *et al.* 2003).
- YBR183w  $\Rightarrow$  Codifica una proteína integral de membrana. Se le atribuye actividad ceramida sintasa. Su delección da lugar a la liberación al medio de cultivo de al menos las proteínas Cwp1p, Ssr1p (ambas con anclaje GPI) y Pir2 (de Groot *et al.* 2001).

- YDL231c  $\Rightarrow$  Codifica una proteína que se localiza en la membrana plasmática. Se le atribuye la responsabilidad del remodelado del  $\beta$ 1,3-glucano. Su delección da lugar a la secreción de  $\beta$ 1,6-glucano y de las proteínas Cwp1p, Ssr1p y Pir2p (de Groot *et al.* 2001).
- YNL080c  $\Rightarrow$  Codifica una proteína localizada en la membrana plasmática. Está implicada en la incorporación de proteínas con anclaje GPI. Su delección da lugar a la secreción de al menos Cwp1p, Ssr1p y Pir2p (de Groot *et al.* 2001).
- YOL092w  $\Rightarrow$  Codifica una proteína integral de membrana. Está implicada en la incorporación de proteínas Pir y su delección da lugar a la liberación de al menos Pir2p al medio (de Groot *et al.* 2001).
- YNL294c  $\Rightarrow$  Codifica una proteína integral de membrana localizada en el retículo endoplasmático y en la membrana plasmática. Se cree que está implicada en la incorporación de proteínas Pir y su delección da lugar a la liberación de al menos Pir2 al medio (de Groot *et al.* 2001).

### 3. ELABORACIÓN DEL VINO.

La fermentación del mosto es un proceso microbiológico complejo que implica interacciones entre levaduras, bacterias y hongos filamentosos. Aunque en mayor o menor medida, puede intervenir un número elevado de especies e incluso de géneros, es claro que el papel principal lo realiza *S. cerevisiae*.

El mosto de uva es un medio que contiene todos los nutrientes necesarios para el crecimiento de *S. cerevisiae*. No obstante, la diferente composición de los mostos, además de ser crucial para las características del producto final, condiciona la evolución del crecimiento de las levaduras. La vinificación es un proceso de fermentación discontinua tipo *batch*: todos los nutrientes se encuentran presentes en el medio de cultivo desde un principio, y su concentración disminuye conforme son consumidos por la levadura, lo que puede provocar que el crecimiento pueda estar condicionado por la

limitación de uno o varios nutrientes. En el mosto podemos encontrar azúcares, ácidos orgánicos, compuestos nitrogenados, polifenoles, sales minerales y también lípidos, todos ellos a concentraciones muy diferentes. El componente más abundante en el mosto, exceptuando el agua es el azúcar, más concretamente los monosacáridos. Los monosacáridos mayoritarios son la glucosa y fructosa que se encuentran en cantidades equimolares (Ough 1992) y su concentración total generalmente es de entre 170 y 220 g/l (Ribéreau-Gayon *et al.* 2000). Con estos valores, la fermentación discurre con normalidad, aunque en mostos con más de 200 g/l se observa una ralentización pudiéndose producir la inhibición del crecimiento por encima de los 250 g/l (Nishino *et al.* 1985). Los ácidos orgánicos son el segundo grupo de compuestos en abundancia tras los azúcares, estando su concentración comprendida entre los 9 y los 27 g/l (Ough 1992). Los ácidos tartárico y málico son los mayoritarios, suponiendo el 90% de la acidez fija (Jackson 1994), mientras que el cítrico y el ascórbico se encuentran en menor cantidad. El contenido en nitrógeno es generalmente el factor más importante desde el punto de vista de la composición del mosto, ya que nutricionalmente, suele ser limitante para el crecimiento de *S. cerevisiae* (Henschke *et al.* 1993). La composición en fuentes nitrogenadas del mosto depende de numerosos factores, como la variedad de uva, la infección de la misma por *Botrytis cinerea* (que elimina gran parte de los nutrientes asimilables por *S. cerevisiae*), el momento de la cosecha, los hábitos de fertilización, la suplementación o no en la bodega y la intensidad de la clarificación de los mostos, especialmente los blancos (Lagunas 1986). Esta variación en cuanto a la cantidad y forma en que se encuentra el nitrógeno en el mosto condiciona el crecimiento celular, la velocidad de fermentación y la tolerancia al etanol. Los compuestos nitrogenados se pueden desglosar de la siguiente manera: amonio (3-10% del total), aminoácidos (25-30%), polipéptidos (25-40%) y proteínas (5-10%). Es importante destacar que *S. cerevisiae* es incapaz de asimilar las fuentes de nitrógeno inorgánico del medio, como nitratos y nitritos, así como tampoco las proteínas y polipéptidos, ya que carece de sistemas de digestión extracelular de este tipo de compuestos, por lo que el crecimiento depende fundamentalmente de la cantidad de amonio y aminoácidos, las fuentes preferidas de nitrógeno (Ough *et al.* 1998).

La fermentación completa de un mosto por *S. cerevisiae* conduce a la producción de 8 a 15% (v/v) de etanol, y otros co-productos fermentativos tales como el glicerol (6-8 g/l), ácidos orgánicos como el acetato, el succinato y el piruvato en

cantidades menores, y alcoholes superiores y ésteres (Barre *et al.* 2000). La fermentación vínica es distinta de la que tiene lugar en otros procesos industriales, como la elaboración de la cerveza, debido a que la elevada concentración de azúcares produce niveles de etanol inhibidores del crecimiento, capaces incluso de afectar a la viabilidad celular. Al inocular un mosto con  $10^6$  células/ml, la fermentación comienza rápidamente. Tras un corto periodo de latencia se inicia el ciclo de crecimiento típico de *S. cerevisiae* en las fermentaciones vínicas, que consta de tres etapas. La primera es una fase de crecimiento limitado que dura entre 2 y 5 días y produce un aumento de la población hasta  $10^7$ - $10^8$  células/ml. En esta fase, la velocidad de crecimiento es máxima y suele consumirse entre un tercio y la mitad de la cantidad inicial de azúcares (Castor *et al.* 1956). A continuación el crecimiento entra en una fase quasi-estacionaria que dura alrededor de 8 días y durante la cual no se produce aumento del número de células. Sin embargo, las células son metabólicamente activas y la velocidad de fermentación sigue manteniéndose en su valor máximo. Finalmente el cultivo entra en una fase de muerte de hasta varias semanas y durante la misma, el número de células viables decrece progresivamente hasta aproximadamente  $10^5$  células/ml. La pérdida de viabilidad va acompañada de una disminución de la velocidad de fermentación debida no únicamente a la disminución del número de células viables, sino también a la inhibición de la actividad metabólica de las células no proliferativas. Con la pérdida de viabilidad celular e inmediatamente a la muerte de las levaduras, se produce la autodegradación enzimática de los constituyentes celulares, fenómeno que se conoce como autólisis (Farrer 1956). Como consecuencia de la autólisis de las levaduras, parte de los productos de la hidrólisis de las macromoléculas intracelulares y de la pared, generados por acción de los enzimas hidrolíticos de la propia célula, son liberados al vino modificando sus propiedades y otorgando algunas de las características deseadas al producto final. Parte de esta liberación también se produce a lo largo de la fermentación y entre los compuestos liberados encontramos proteínas, ésteres, polisacáridos y manoproteínas de la pared celular (Barre *et al.* 2000).

#### **4. PROPIEDADES ENOLÓGICAS DE LAS MANOPROTEÍNAS.**

Las manoproteínas de la pared celular de *S. cerevisiae*, se han convertido en los últimos años en uno de los productos de mayor interés para la mejora de procesos

tecnológicos y de las características sensoriales de los vinos, por lo que están ganando terreno en las bodegas de diversas maneras. Mediante el método tradicional de crianza sobre lías, se consigue aumentar la concentración de manoproteínas en el vino al prolongar, una vez la fermentación ha terminado, el contacto del mismo con los restos de levaduras. Además, se están empezando a comercializar cepas vínicas de *S. cerevisiae* (como por ejemplo la cepa Lalvin BM45®, comercializada por Lallemant), entre cuyas características destaca una abundante producción de manoproteínas durante la fermentación. Por otro lado, también se comercializan preparados enzimáticos que ayudan a liberar manoproteínas a partir de la pared celular de las levaduras, así como paredes de levadura tratadas enzimáticamente, con el fin de favorecer esta liberación.

La O.I.V. (Organización Internacional de la Viña y el Vino) en resolución C.19/2006 autoriza como práctica enológica lícita, el uso de manoproteínas de levadura en vinos blancos y tintos, y actualmente existen varios preparados comerciales ricos en manoproteínas.

A las manoproteínas se les atribuyen diversas propiedades en enología, entre las que destacan su capacidad de evitar o minimizar algunas alteraciones que pueden sufrir los vinos, y que afectan negativamente a su calidad, reduciendo su valor comercial.

#### **4.1. Protección frente a la quiebra proteica.**

La quiebra proteica es una alteración producida en vinos blancos y rosados con una elevada concentración de proteínas de uva. Las variedades de uva *Sauvignon Blanc* y “Moscatel de grano menudo” dan lugar frecuentemente a vinos susceptibles de sufrir este tipo de alteración. En estos vinos, como consecuencia de las altas temperaturas o el prolongado tiempo de almacenaje, se puede producir una precipitación de las proteínas de la uva, formando agregados, dándoles un aspecto turbio. Esto puede ser especialmente problemático si se produce una vez que el vino ha sido embotellado, dado que su calidad es juzgada en primer lugar por su limpidez, y la presencia de partículas en suspensión puede ser rechazada por el consumidor al percibir que el vino puede estar microbiológicamente alterado (Waters *et al.* 2000).

La turbidez no es debida tanto a la concentración total de proteínas de la uva, como al contenido en aquellas fracciones proteicas que por su tamaño y propiedades isoeléctricas, son más susceptibles a limitaciones de solubilidad. Las proteínas más susceptibles de generar quiebra proteica son de pequeño tamaño y con un punto isoeléctrico bajo ( $pI= 4.1$  a  $5.8$ ) (Hsu *et al.* 1987, Waters *et al.* 1991). Estas proteínas son las denominadas proteínas PR (de *Pathogenesis-Related*) que son producidas por la planta como defensa contra la infección de hongos patógenos (Waters *et al.* 1996). Waters *et al.* (1996) purificaron e identificaron las tres proteínas PR más abundantes en el vino. Se identificaron dos proteínas con masas moleculares aparentes de 32 y 28 kDa (determinadas mediante SDS-PAGE) con homología con las quitinasas, y una tercera proteína de 24 kDa con homología con las proteínas TL (de *Thaumatococcus*-Like, proteínas similares a la taumatina). Robinson *et al.* (1997) identificaron la quitinasa *VvChi4A* como la responsable de las dos bandas de 32 y de 28 kDa, siendo la segunda, consecuencia de la proteólisis de la primera. La quitinasa, junto con la  $\beta$ -1,3-glucanasa es una de las proteínas de defensa contra la infección por hongos más importantes, actuando en la digestión de su pared celular. Entre las proteínas TL, que incluye las osmotinas, la VVTL1 (de *Vitis vinifera* *Thaumatococcus*-Like protein 1) es una de las proteínas más abundantes en extractos proteicos de uva madura (Tattersall *et al.* 1997), y su identidad corresponde a la de la proteína de 24 kDa identificada por Waters *et al.* (1996). La naturaleza de proteínas de defensa de las proteínas PR, hace que no se encuentren en los diferentes órganos de las plantas de manera constitutiva, sino que se producen en los frutos, que son ricos en azúcares y otros nutrientes, haciéndolos un objetivo ideal para los patógenos (Robinson *et al.* 1997). El aumento de su concentración en la uva se produce durante la maduración. De hecho, el aumento de las proteínas PR y el de la concentración de azúcares durante la maduración están relacionados, siendo la expresión de las proteínas PR inducida mediante la acción de las hexosas. Las proteínas PR presentan actividad antifúngica *per se*, sin embargo su actividad puede verse potenciada hasta en un 70% en presencia de concentraciones fisiológicas de hexosas (Salzman *et al.* 1998). De hecho, la interacción entre las hexosas y las proteínas antifúngicas constituye un mecanismo de defensa regulado frente a la infección por hongos patógenos como *Uncinula necator*, *Guignardia bidwellii* y *Botrytis cinerea* (Tattersall *et al.* 1997). Uno de los mecanismos propuestos para explicar este hecho se basa en que las hexosas funcionarían reprimiendo la expresión de genes del hongo patógeno regulados por represión catabólica. Esto estaría favorecido

por la acción de las proteínas PR que mediante su acción en la pared, favorecerían la formación de poros en la membrana aumentando el paso de los azúcares en la célula. Otro de los mecanismos propuestos sería que la presencia de hexosas favorecería la estabilización de las proteínas PR frente a la desnaturalización (Salzman *et al.* 1998).

Las proteínas PR son estables a pH ácidos y muy resistentes a la proteólisis, lo que hace que la vinificación suponga su extracción selectiva. El prensado destruye la compartimentalización de la uva liberando ácidos vacuolares y enzimas hidrolíticas. La posterior fermentación contribuye a aumentar el *pool* de enzimas proteolíticas (Lagace *et al.* 1990). Esta combinación de bajo pH y de actividad proteolítica asegura que solamente las proteínas resistentes a esas condiciones, como las proteínas PR, se mantengan intactas tras el proceso de fermentación (Waters *et al.* 2005).

La desestabilización de las proteínas de la uva en el vino se produce principalmente debido a las elevadas temperaturas o el prolongado tiempo de almacenaje. Esto supone un problema especialmente en países con climas cálidos donde las condiciones ambientales favorecen esta alteración. Las uvas cultivadas en estos climas alcanzan concentraciones de azúcar superiores a las de lugares con climas más suaves, con la consiguiente elevada concentración de las proteínas PR, responsables de la quiebra proteica. La formación de quiebra proteica es dependiente de la presencia de las proteínas de la uva, pero también de otros componentes. Pockock *et al.* (2007) identificaron el anión sulfato como necesario para la formación de quiebra proteica. Además, vinos tratados con PVPP (polivinil polipirrolidona), presentan una reducción en la formación de quiebra, indicando la participación de los taninos en esta formación (Pockock *et al.* 2007). De hecho, Vivas *et al.* (2001) demostraron que el tratamiento de vino con taninos de la pepita de la uva, producía un aumento en la precipitación de las proteínas, proponiendo su uso en mostos para eliminar las proteínas susceptibles de producir quiebra en el vino.

En las bodegas, el principal sistema de evitar la quiebra proteica es la clarificación del vino con bentonita (Toland *et al.* 1996, Pellerin *et al.* 1994, Waters *et al.* 1994, Dupin *et al.* 2000, Lagace *et al.* 1990). La bentonita es un arcilla compuesta principalmente de óxidos de sílice y de aluminio (Waters *et al.* 2000), y contiene dos tipos de mineral, la kaolinita y la montmorilonita, siendo ésta última la más abundante

(Bowyer *et al.* 2007). La montmorillonita se organiza en láminas y los átomos de aluminio, que forma un ión trivalente, pueden estar substituidos por átomos de magnesio o de calcio, que forman iones divalentes. Esta substitución proporciona a la molécula una carga negativa neta que se estabiliza mediante su asociación con cationes  $\text{Na}^+$  o  $\text{Ca}^{2+}$ , dando lugar a la bentonita de sodio o de calcio respectivamente.

Al hidratar la bentonita, su conformación se desestructura y las láminas se separan de los cationes que las mantienen unidas. Al añadir bentonita hidratada al vino, las proteínas presentes, que tienen mayorariamente carga positiva al pH del vino, son electrostáticamente atraídas por las láminas, donde se quedarán adsorbidas. Se produce por tanto un proceso de intercambio iónico en el que cationes  $\text{Na}^+$  o  $\text{Ca}^{2+}$  unidos a las láminas de bentonita son liberados al medio, y son substituidos por otros presentes en el vino, entre los que se encuentran las proteínas PR. De este modo, al sedimentar las proteínas unidas a las partículas de bentonita, consiguen ser eliminadas del vino (Bowyer *et al.* 2007), y una vez eliminadas se evita la producción de quiebra proteica.

Este sistema sin embargo, plantea una serie de inconvenientes. Por un lado no todas las fracciones proteicas del vino contribuyen de igual manera a la quiebra proteica. Por otro lado, no todas las proteínas del vino tienen la misma facilidad para ser eliminadas, son precisamente las proteínas menos estables, las más difícilmente eliminables mediante bentonita (Ledoux *et al.* 1992). Las proteínas neutras o cargadas negativamente, tienen más dificultades para unirse a la bentonita (Lagace *et al.* 1990) y las de alto peso molecular no se ven afectadas por ella (Vanrell *et al.* 2007). Para eliminar eficazmente las proteínas susceptibles de formar agregados, las dosis de bentonita necesarias pueden ser muy altas. Dado que la unión a la bentonita es inespecífica, su adición a un vino en altas concentraciones puede cambiar las características organolépticas del mismo, al eliminar otros compuestos importantes (Waters *et al.* 2000). Se ha observado que vinos tratados con bentonita pueden ver disminuida su concentración de alcohol, la intensidad de color y el contenido en polifenoles (Alex *et al.* 1997). Además entre el 5 y el 20% del volumen del vino se puede perder en el tratamiento con bentonita (Lagace *et al.* 1990). Debido a estos inconvenientes, existe un interés creciente por el desarrollo de métodos alternativos al uso de la bentonita o que contribuyan a disminuir la dosis necesaria para la estabilización del vino, disminuyendo así sus efectos negativos.

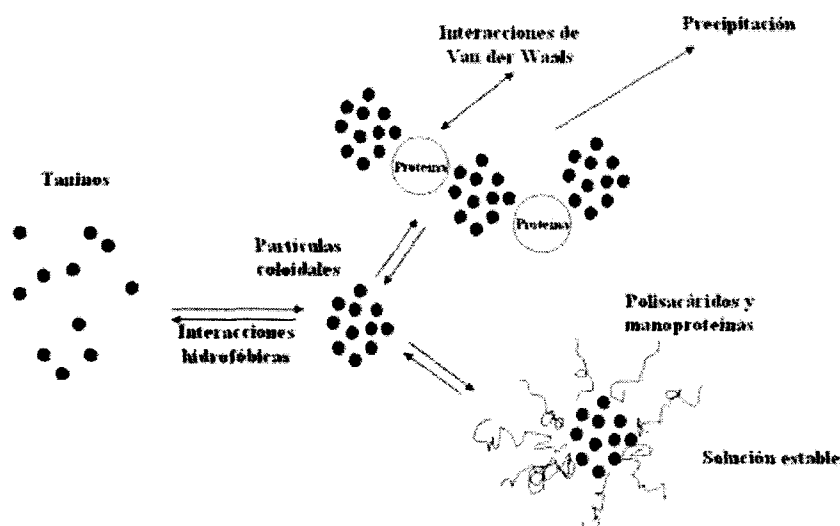


La ultrafiltración se postuló como alternativa al uso de la bentonita, sin embargo los vinos ultrafiltrados ven también modificadas sus propiedades organolépticas (Pellerin *et al.* 1994). La hidrólisis enzimática de las proteínas responsables de la turbidez se barajó también como alternativa, sin embargo las proteínas termoinestables de la uva resultan ser las más resistentes a la acción de proteasas de levadura o de hongos exógenos (Waters *et al.* 1992, Moine-Ledoux *et al.* 1999). El uso de las proteasas no tiene efecto sobre la quiebra proteica (Pellerin *et al.* 1994, Ledoux *et al.* 1992), y solamente se ha observado una reducción mediante el uso de proteasas, en un proceso combinado con calor (Pocock *et al.* 2003). Esta resistencia a la hidrólisis por proteasas es debida a la naturaleza de proteínas de defensa de las proteínas PR (Waters 1996).

Recientemente se ha propuesto el uso de quitina como alternativa a la bentonita, para eliminar las proteínas susceptibles de generar quiebra proteica (Vincenzi *et al.* 2005). Las quitinasas de la uva, responsables junto a las proteínas TL de formar quiebra proteica, poseen un dominio de unión a quitina (Robinson *et al.* 1997). El tratamiento del vino con quitina conllevaría su unión con la quitinasa y la eliminación del medio de ambas moléculas. De hecho, se ha observado que el tratamiento del vino con quitina consigue eliminar específicamente la quitinasa de tipo IV, disminuyendo en un 29% el contenido de proteína del vino, y reduciendo la quiebra proteica hasta en un 80% (Vincenzi *et al.* 2005). Sin embargo, los efectos sobre la calidad sensorial de los vinos, así como su estabilidad a largo plazo, aun necesitan ser estudiados en condiciones de vinificación.

Los vinos criados sobre lías tienen la misma concentración de proteínas de la uva que aquellos que no han sufrido este tratamiento, y sin embargo muestran una mayor estabilidad proteica (Dupin *et al.* 2000). Esta mejora, se debe al efecto protector de las manoproteínas liberadas de las paredes de las levaduras. De hecho, la adición de manoproteínas a un vino permite aumentar su estabilidad proteica y por lo tanto, disminuir la dosis de bentonita necesaria para su estabilización (Ledoux *et al.* 1992). La quiebra proteica es un proceso que se produce en dos pasos, siendo el primero de ellos la desnaturalización de las proteínas. En un segundo paso, se produciría la agregación de las proteínas desnaturalizadas, siendo el tamaño de los agregados dependiente de la inclusión de otros solutos del vino tales como iones metálicos o compuestos fenólicos

(Brown *et al.* 2007). La presencia de manoproteínas en el vino no evita la desnaturalización de las proteínas, sino que contribuye a la formación de partículas coloidales de menor tamaño, no visibles al ojo humano, dándole a los vinos un aspecto claro (Pellerin *et al.* 1994, Waters *et al.* 1993). El mecanismo propuesto para este efecto protector sería la competición de las manoproteínas con las proteínas PR por su unión a componentes no proteicos del vino (como los taninos), necesarios para la formación de los agregados insolubles de proteínas (figura 6) (Waters *et al.* 2005).



**Figura 6:** Mecanismo mediante el cual las manoproteínas evitan la precipitación de los agregados formados entre proteínas de la uva desnaturalizadas y los taninos del vino (Zamora 2005).

Algunas de las manoproteínas responsables de proteger el vino frente a quiebra proteica ya han sido identificadas. Así, Moine-Ledoux *et al.* (1999) identificaron una glicoproteína de 32 kDa correspondiente a un fragmento de la invertasa, como responsable de disminuir la quiebra proteica. Por otra parte, la invertasa es capaz por sí misma de estabilizar vinos susceptibles de sufrir quiebra proteica. Waters *et al.* (1994) consiguieron aislar del vino una manoproteína a la que denominaron HPF1 (de *Haze Protecting Factor*) con capacidad para estabilizar el vino frente a quiebra proteica. Por otra parte, Brown *et al.* (2007) identificaron los genes *YOL155c* e *YDR055w* que codifican las proteínas Hpf1p y Hpf2p respectivamente. Su sobreexpresión en cepas de laboratorio y su posterior adición al vino da lugar a una considerable reducción de la turbidez del mismo. El hecho de que estén presentes en el vino de forma natural, las hace especialmente atractivas desde el punto de vista de su

uso industrial. No obstante, los niveles en los que son liberadas al vino por *S. cerevisiae*, en condiciones de vinificación normales, son muy bajos, de modo que su concentración debería ser aumentada para poder tener una relevancia comercial.

#### **4.2. Protección frente a la precipitación tartárica.**

La quiebra o precipitación tartárica es una alteración que se produce en vinos con una elevada concentración de sales de bitartrato potásico, y en ocasiones de tartrato cálcico. Como consecuencia de las bajas temperaturas y del aumento de la concentración de etanol durante la fermentación, estas sales son susceptibles de dar lugar a precipitados en forma de cristales. Al igual que lo observado con la quiebra proteica, puede ser problemático si se produce después del embotellado, por el rechazo que genera la presencia de cristales en las botellas por parte del consumidor. La cristalización depende, entre otros factores, de la concentración de iones, del pH, del contenido en alcohol y de la temperatura. La mayor parte de los procedimientos de estabilización tartárica de los vinos se basan en la aceleración de la cristalización y la eliminación de los cristales formados antes del embotellado. Esto se consigue normalmente mediante el tratamiento del vino por frío, al que se le pueden añadir cristales de bitartrato como iniciadores de la cristalización.

Los vinos que han sufrido una crianza sobre lías tienen menos tendencia a presentar cristales de tartrato, y esto es debido al efecto protector que ejercen las manoproteínas liberadas de la pared de las levaduras durante la crianza (Feuillat *et al.* 1998). De hecho, una de las manoproteínas con capacidad de estabilizar los vinos frente a quiebra tartárica fue identificada por Moine-Ledoux *et al.* (2002) y existen productos comerciales basados en manoproteínas aplicados a evitar la precipitación tartárica. El Mannostab® (Laffort, S.A.) es un producto purificado de manoproteínas de la pared celular, obtenido por hidrólisis de  $\beta$ -1,3-endo- y exoglucanasas y  $\beta$ -1,6-endoglucanasas, dirigido a la prevención de la precipitación tartárica (Moine-Ledoux *et al.* 1997). La adición al vino de entre 15 y 25 g/hL produce una estabilidad comparable al tratamiento con frío (Moine-Ledoux *et al.* 1997).

#### 4.3. Otras propiedades.

Además de proteger el vino frente a las alteraciones anteriormente mencionadas, a las manoproteínas se les atribuyen propiedades de otro tipo:

##### 4.3.1. Adsorción de Ocratoxina A.

La Ocratoxina A (OTA) es una micotoxina encontrada frecuentemente en uvas, mosto y vino (Zimmerli *et al.* 1996, Caridi 2006). Se ha demostrado que el uso de cepas seleccionadas de *S. cerevisiae* puede disminuir el contenido del vino en OTA durante la fermentación (Scott *et al.* 1995, Caridi *et al.* 2005). Esto es de relevante importancia ya que la Unión Europea ha impuesto para vinos producidos a partir de 2005 unos niveles de OTA máximos de 2.0 ppb (Annon 2005).

##### 4.3.2. Retención de sustancias aromáticas.

Las manoproteínas y otros polisacáridos liberados por la levadura durante la fermentación alcohólica influyen en la volatilidad de las sustancias del aroma, con el consiguiente efecto sobre las propiedades sensoriales del vino. La  $\beta$ -ionona, el etil hexanoato, y el octanal, son retenidos por manoproteínas con una elevada proporción de proteína (Lubbers *et al.* 1994). La retención de estos compuestos antes del embotellado permitiría unos niveles superiores en el producto final, con el consiguiente efecto positivo sobre las propiedades organolépticas.

##### 4.3.3. Disminución de la astringencia.

La astringencia en los vinos tintos está ligada a la interacción entre los taninos del vino y las proteínas salivares. Se ha demostrado que la fracción proteica de las manoproteínas permite fijar los taninos (Escot *et al.* 2003), de modo que se limitan las reacciones con las proteínas salivares y se ve reducida así la astringencia del vino (Saucier *et al.* 1999).

#### 4.3.4. *Estabilización del color.*

Los antocianos poliméricos (responsables del color en vinos tintos) son más estables y hacen al vino menos sensible a los cambios de color (Mirabel *et al.* 1999). La estabilización del color se produciría por la asociación entre las manoproteínas y estos antocianos, mediante un mecanismo similar al que se produce en la asociación entre las manoproteínas y los taninos (Escotet *et al.* 2001). La densidad de carga de los antocianos copigmentados (también más estables) es positiva y su estabilidad está favorecida por el bitartrato del medio (Boulton 2001), de este modo la estabilización que ejercen las manoproteínas sobre las sales de bitartrato estaría indirectamente influyendo en la estabilidad de los antocianos.

#### 4.3.5. *Estimulación del crecimiento de las bacterias lácticas.*

La fermentación maloláctica consiste en la conversión de L-malato a L-Lactato y CO<sub>2</sub>, y es llevada a cabo por las bacterias lácticas. Juega un papel fundamental en la vinificación, ya que además de disminuir la acidez total, mejora la estabilidad del vino y sus propiedades organolépticas (Caridi 2005). Las manoproteínas han sido asociadas con la estimulación del crecimiento de las bacterias lácticas (Guilloux-Benattier *et al.* 1995, Rosi *et al.* 1999). La estimulación de este crecimiento podría deberse a la unión de las manoproteínas con cadenas de ácidos grasos sintetizados por *Saccharomyces* que inhiben el crecimiento de las bacterias lácticas, de modo que su eliminación favorecería su crecimiento. Además, las bacterias lácticas son capaces de hidrolizar las manoproteínas, aumentando el contenido nutricional del medio y estimulando su actividad (Guilloux-Benattier *et al.* 2003).

#### 4.3.6. *Estabilización de la espuma en vinos espumosos.*

Los vinos espumosos con una mayor concentración de manoproteínas de levadura, tienen una espuma más persistente (Feuillat 1987, 2003).

#### **4.4. Enriquecimiento del vino en manoproteínas.**

Las numerosas propiedades de las manoproteínas expuestas, muestran el interés que existe por su utilización para la mejora de las características del vino. Actualmente el sistema más utilizado para el enriquecimiento del vino en manoproteínas es el contacto con las lías de levadura, una vez la fermentación ha terminado. Esta técnica sin embargo presenta varias limitaciones. Es una práctica complicada y trabajosa, que implica la inmovilización de grandes stocks y una importante dedicación de los recursos de la bodega. Asimismo, entraña cierto riesgo de reducción (Chatonnet 2000, Feuillat *et al.* 2001) y de aparición de alteraciones microbiológicas (Chatonnet 2000). Por ello, su substitución por otros modos de enriquecimiento de manoproteínas resulta una alternativa interesante.

En la actualidad existen varios métodos de extracción de las manoproteínas de la pared celular de las levaduras, entre los que se encuentran la extracción enzimática y la extracción física por tratamientos térmicos. En general se encuentran disponibles pocas preparaciones comerciales a base de manoproteínas purificadas, y normalmente se emplean derivados no purificados de levadura, como extractos o autolisados.

El uso de las manoproteínas como aditivos enológicos está sujeto a algunas limitaciones de tipo normativo. En Estados Unidos se pueden utilizar únicamente como nutrientes para las levaduras, en Sudáfrica no están permitidas, y en Australia y Nueva Zelanda se está actualmente regulando su uso. Respecto a España, la Unión Europea ha autorizado recientemente su uso para garantizar la estabilización tartárica y proteica de los vinos, aunque actualmente no existe una directiva que especifique sus modalidades de uso. En este sentido, la utilización de levaduras superproductoras de manoproteínas constituiría una alternativa interesante, ya que el vino podría verse enriquecido al final de la fermentación. De este modo, no sería necesaria la inmovilización de stocks de vino durante la crianza sobre lías, con la consiguiente ventaja económica, evitando además los efectos negativos que pueden estar asociados a su uso. Asimismo, se evitaría la utilización de aditivos industriales, notablemente más caros que el uso de levadura seca activa.

## **5. APLICACIÓN DE LA INGENIERÍA GENÉTICA A LA MEJORA DE LAS LEVADURAS VÍNICAS.**

### **5.1. Consideraciones generales.**

La biotecnología implica la utilización de un organismo vivo o un producto generado por él con fines comerciales. Cuando estos organismos son empleados para la producción de alimentos se habla de biotecnología de alimentos. Aunque la biotecnología de alimentos sea un concepto relativamente novedoso, ésta lleva aplicándose desde los orígenes de la agricultura y la ganadería hace millones de años. Desde ese momento, la biotecnología ha sido una herramienta de mejora de las propiedades de los alimentos producidos. Probablemente, la fuente de mejora en los inicios de la biotecnología estaría basada en la selección artificial de aquellos animales o vegetales que ofrecieran las características más apropiadas, favoreciendo el cruzamiento entre ellos. Una fuente de mejora posterior implicaría la generación de híbridos, mediante el cruzamiento intencionado entre los individuos más favorecidos de diferentes razas, variedades o especies

Sin embargo, la mejora de los microorganismos utilizados en la obtención de alimentos fermentados, como el vino, es algo relativamente reciente, una vez se establecieron los conocimientos sobre la función de estos microorganismos en el proceso de transformación de estos alimentos. El aislamiento de cultivos puros de levaduras vínicas a finales del siglo XIX, junto con el aumento de los conocimientos genéticos abrió la posibilidad de hacer mejora de estos microorganismos aplicando nuevas técnicas más eficaces, las que hoy se conocen con el nombre de técnicas de genética clásica. Estas nuevas estrategias son una vía más rápida para la mejora de levaduras al inducir variaciones genéticas con una frecuencia superior a la natural, permitiendo seleccionar aquellas cepas que ofrecen las características deseadas. Los métodos de mejora genética por técnicas clásicas aplicados a levaduras vínicas implican la mutagénesis al azar, la hibridación sexual o la fusión de protoplastos (Spencer *et al.* 1983, Pretorius 2000, Bisson 2004), seguidas por la selección de aquellas cepas que adquieren el fenotipo deseado.

La irrupción de la tecnología del DNA recombinante junto con los avances en el campo de la biología molecular del organismo modelo *S. cerevisiae*, han permitido la aplicación de la ingeniería genética como estrategia más específica y segura para la mejora genética de levaduras implicadas en procesos industriales. Estas nuevas estrategias están basadas en la introducción controlada de genes o mutaciones concretas cuya expresión confiere el fenotipo deseado. La ingeniería genética ofrece claras ventajas sobre los sistemas de mejora basados en métodos clásicos. En primer lugar implica modificaciones genéticas dirigidas, de tal forma que se conoce en todo momento la naturaleza y la ubicación de la variación, pudiendo asignar el cambio fenotípico a una modificación genética concreta. Por otro lado, la tecnología del DNA recombinante permite la expresión en el huésped de genes heterólogos, lo que abre la posibilidad de conferir nuevos fenotipos que no se podrían obtener empleando la genética clásica como sistema de mejora.

Para la aplicación de la ingeniería genética sin embargo, resultó esencial el desarrollo de métodos eficaces que permitieran introducir una molécula de DNA exógeno en una célula (fenómeno conocido como transformación), el desarrollo de vectores para la clonación de genes y el desarrollo de marcadores para la selección de células transformadas con el DNA de interés.

### *5.1.1. Sistemas de transformación.*

Actualmente existen varios sistemas disponibles de transformación de levaduras. El uso de esferoplastos (células con la pared parcialmente degradada mediante métodos enzimáticos) fue uno de los primeros métodos desarrollados (Hinnen *et al.* 1978). La pérdida parcial de la pared celular aumenta la permeabilidad de las células al DNA exógeno, lo que facilita su transformación, aunque posteriormente es necesario un tiempo de regeneración de la pared en un medio de estabilización isotónico. Otro sistema de transformación es la electroporación que consiste en la aplicación de descargas eléctricas de alta intensidad en fracciones de segundo. De esta manera, se generan poros sobre la superficie celular facilitando la entrada de DNA exógeno (Delorme 1989). Actualmente, el método de transformación de levaduras más extendido es el que emplea células íntegras tratadas con acetato de litio y polietilenglicol,



favoreciéndose la entrada del DNA exógeno mediante la aplicación de un choque térmico (Ito *et al.* 1983).

#### 5.1.2. Vectores para la clonación de genes.

La mayoría de los vectores actualmente utilizados para la clonación de genes de interés en levaduras se conocen como “plásmidos lanzadera”, ya que contienen secuencias para la replicación autónoma tanto en bacterias como en levaduras, y genes de selección en ambos organismos. También poseen regiones denominadas MCS (de Multiple Cloning Site) que consisten en lugares donde en un espacio de alrededor de 50 pb, se concentran numerosas dianas de enzimas de restricción, sirviendo de base para la clonación de fragmentos de DNA mediante restricción-ligación.

Los YEp (de *Yeast Episomic plasmid*) fueron los primeros plásmidos contruidos con capacidad auto-replicativa en levaduras. Se obtuvieron por la recombinación de un vector de clonación en bacterias y el plásmido 2  $\mu$ m natural de levaduras (Beggs 1978). El origen de replicación del plásmido 2  $\mu$ m ofrece la ventaja de que los vectores que lo poseen pueden presentarse en las células huésped en un número de copias elevado, de hasta 200 copias.

Los YRp (de *Yeast Replicating plasmid*) fueron diseñados por Struhl *et al.* (1979) que aislaron vectores bacterianos con fragmentos del genoma de levadura con capacidad replicativa en levaduras. Estas secuencias cromosómicas aisladas son las denominadas secuencias de replicación autónoma. Los YRp suelen presentarse en un número de 1 ó 2 copias por célula de levadura, pero son muy inestables en ausencia de presión selectiva ya que por razones desconocidas tienden a mantenerse asociados a la célula madre y no se distribuyen eficientemente a la célula hija. Un incremento en la estabilidad de los plásmidos de bajo número de copia se consiguió mediante la construcción de los YCp (de *Yeast Centromeric plasmid*) (Clarke *et al.* 1980). Estos plásmidos, aparte de poseer la secuencia ARS, tienen una secuencia centromérica de levadura (CEN) que favorece su segregación en la célula hija durante la división celular.

Además de estos plásmidos, todos ellos circulares y con posibilidad para la replicación autónoma, existen otros vectores que no cumplen ambos requisitos. Los YIp

(de *Yeast Integrating plasmid*) son plásmidos circulares pero no poseen secuencias de replicación autónoma en levaduras de modo que la única manera de mantenerse en las células es su integración en el genoma (Hinnen *et al.* 1978). Los YAC (de *Yeast Artificial Chromosome*) son vectores lineales con secuencias teloméricas en sus extremos, en los que es posible clonar fragmentos tan grandes como 40 kb (Szostak *et al.* 1982)

### 5.1.3. Marcadores de selección.

Los marcadores de selección más utilizados son genes que complementan auxotrofías. Una cepa auxótrofa para leucina (con un genotipo *leu2<sup>-</sup>*), carece del gen que codifica una de las enzimas necesaria para la síntesis de leucina, de modo que es incapaz de sintetizar este compuesto, y solamente puede crecer en un medio suplementado con este aminoácido. El gen silvestre *LEU2* codifica la enzima necesaria para la síntesis de leucina defectiva en las cepas *leu2<sup>-</sup>*. Si se transforman cepas *leu2<sup>-</sup>* con un plásmido que contenga el gen *LEU2*, solamente aquellas que lo hayan adquirido serán capaces de sintetizar leucina. De este modo, al ponerlas en un medio carente de este aminoácido, las células que hayan adquirido el plásmido pueden ser seleccionadas, ya que son únicas células que crecerán. Otros ejemplos de genes que complementan auxotrofías empleados como marcadores de selección son *HIS3*, *TRP1* y *URA3*, necesarios para la síntesis de histidina, triptófano y uridina, respectivamente.

### 5.2. Especificidades de las levaduras vínicas.

Las levaduras vínicas y las de laboratorio presentan importantes diferencias de modo que su manipulación genética, aunque utilice procedimientos y técnicas comunes, implica un abordaje diferente. La mayoría de las cepas de laboratorio son haploides, presentan una copia de cada cromosoma, por lo que no es difícil encontrar mutantes auxótrofos con un fenotipo recesivo, tanto naturales como inducidos. Las levaduras industriales sin embargo son genéticamente más complejas, y generalmente son aneuploides, con un número diferente de copias para cada cromosoma, o poliploides, con más de dos copias. Esta ploidía implica que no se hayan aislado, de modo natural, levaduras industriales auxótrofas. Si bien se han construido mutantes de delección de levaduras de laboratorio presentando una o varias auxotrofías, la ploidía de las cepas

industriales dificulta la construcción en el laboratorio de mutantes de este tipo. A pesar de ello, Puig *et al.* (1998) desarrollaron una levadura vínica auxótrofa para uridina mediante la interrupción secuencial de las dos copias del gen *URA3* del genoma de la cepa T73. De hecho, esta levadura ha sido utilizada en el desarrollo del presente estudio. Sólo muy recientemente se han llegado a obtener una serie de mutantes auxotrófos de levaduras industriales diploides mediante la aplicación de un proceso mutagénico con luz ultravioleta (Hashimoto *et al.* 2005). Estas cepas industriales permiten la utilización de marcadores prototrofos en experimentos de transformación.

El avance fundamental que ha permitido la aplicación de la ingeniería genética en levaduras industriales, ha sido el desarrollo de nuevos sistemas de selección basados en el empleo de marcadores dominantes que confieren fenotipos de resistencia. Estos sistemas permiten una selección directa de los transformantes y ofrecen la ventaja de que no requieren la modificación genética previa de las levaduras receptoras. Estos marcadores ofrecen algunas desventajas frente a los marcadores de prototrofías como son las menores frecuencias de transformación y las mayores frecuencias de falsos positivos por la aparición de mutantes resistentes espontáneos (Shimura *et al.* 1993, Park *et al.* 1999).

Los primeros sistemas de selección aplicados para la obtención de levaduras industriales recombinantes estaban basados en su mayoría en el uso de genes heterólogos de resistencia a antibióticos, valiéndose así del fenotipo de resistencia natural de otros organismos. Uno de los primeros marcadores de selección utilizados fue el gen de resistencia *APT*, que codifica para la enzima aminoglucósido fosfotransferasa en bacterias, y confiere resistencia a G418, un inhibidor de la síntesis de proteínas derivado de la gentamicina (Jiménez *et al.* 1980). Las frecuencias de transformación obtenidas originalmente fueron mejoradas tras la introducción de determinadas variantes en el sistema de selección, incluyendo un período de incubación entre la transformación y la aplicación de la presión selectiva, para permitir la expresión del fenotipo de resistencia (Webster *et al.* 1983). La construcción posterior de un gen *APT* heterólogo regulado por las secuencias de un promotor y terminador de levadura (Hadfield *et al.* 1990), contribuyó a la mejora de su uso como marcador de selección.

La mayoría de los marcadores de selección de levaduras industriales descritos confieren resistencia a antibióticos. Sin embargo, existe un rechazo social generalizado en relación con el uso de este tipo de genes de resistencia para la obtención de organismos modificados genéticamente en el sector agroalimentario. Aunque no se ha demostrado científicamente que el empleo de estos marcadores implique algún riesgo medioambiental o de salud sobre los consumidores, se ha extendido el temor de que estos genes pueden transferirse horizontalmente a las bacterias residentes en el intestino, con la consiguiente adquisición de resistencias a antibióticos por parte de estos microorganismos. Esta presión social ha provocado que la Unión Europea haya prohibido a partir del año 2005 el empleo en su territorio de marcadores de resistencia a antibióticos para la obtención de alimentos transgénicos.

Alternativas biotecnológicas a esta restricción metodológica son la aplicación de estrategias genéticas para la eliminación específica del marcador de selección (Hirosawa *et al.* 2004), o bien la utilización de genes que confieran resistencia dominante a compuestos diferentes a los antibióticos. De hecho, se encuentran disponibles varios genes del propio genoma de *S. cerevisiae*, empleados como marcadores de selección. Un ejemplo de estos genes lo constituye *LEU4-I*, una forma mutante del gen *LEU4* que confiere resistencia a 5,5,5-trifluoro-DL-leucina. Este gen pertenece a un grupo de marcadores de resistencia a análogos de aminoácidos que tienen la propiedad adicional de inducir la acumulación de compuestos aromáticos deseables en diferentes bebidas alcohólicas, entre ellas el vino (Bendon *et al.* 1999). *ARO4-OF*, un alelo mutante del gen *ARO4*, pertenece también a este grupo de marcadores productores de aromas. *ARO4* es un gen implicado en la síntesis de aminoácidos aromáticos como la L-Phe o la L-Tyr, y es sensible a la inhibición por este último. El alelo *ARO4-OF* consiste en una transversión de citosina a timina en la posición 496 de la ORF del gen, lo que se traduce en la sustitución del residuo glutámico 166 de la proteína por una lisina (Fukuda *et al.* 1992). Las cepas portadoras del alelo *ARO4-OF*, presentan resistencia a la *para*-fluoro-DL-fenilalanina (PFP) (un análogo de la L-Phe), en presencia de L-Tyr.

### 5.3. Ejemplos de aplicaciones de mejora genética de levaduras vínicas mediante ingeniería genética.

Fundamentalmente la mejora genética de las levaduras vínicas se ha centrado en tres aspectos; la introducción de mejoras en el proceso de vinificación, la mejora de las características higiénico-sanitarias del producto y la mejora de la calidad organoléptica de los vinos obtenidos.

Se han construido diferentes cepas recombinantes que presentan un flujo de carbono parcialmente favorecido hacia la formación de glicerol, en detrimento de la producción de etanol y CO<sub>2</sub>. Aparte de la importancia del glicerol en la calidad sensorial de los vinos, la utilización de estas cepas, que generan vinos de baja graduación alcohólica, puede suponer una alternativa más económica a los métodos físicos de eliminación de etanol, y que adicionalmente suelen producir la pérdida de aromas. Michnick *et al.* (1997) clonaron el gen *GPD1*, que codifica la enzima glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (GPDH), en un plásmido episómico y bajo el control del promotor constitutivo del gen *ADHI*. GPDH cataliza la reducción de la dihidroxiacetona 3-fosfato en glicerol 3-fosfato, que finalmente es defosforilado por la enzima glicerol 3-fosfatasa para dar lugar a glicerol. Un medio sintético fermentado con esta cepa presentó concentraciones de glicerol hasta 4 veces por encima de los niveles obtenidos con la levadura control, así como una reducción del 20% en el contenido de etanol (Michnick *et al.* 1997). Sin embargo, productos no deseados como el ácido acético y la acetoína aparecieron en elevadas concentraciones. Ensayos de microvinificación realizados con una cepa industrial transformada con la misma construcción, generó vinos con 1,5-2,5 veces más glicerol y 5-10 g/l menos de etanol (Remize *et al.* 1999). En estos casos solamente se detectaron trazas de acetoína, aunque los vinos producidos seguían presentando niveles de ácido acético 2-3 veces por encima de los niveles normales. Eglinton *et al.* (2002) solucionaron el problema de la sobreproducción de ácido acético mediante la delección del gen *ALD6*, que codifica la enzima acetaldehído deshidrogenasa, en una cepa que sobreexpresaba el gen *GPD2*. Esta levadura producía unas cantidades de ácido acético por debajo de las obtenidas por la cepa salvaje e igualmente producía 2.5 veces más de glicerol y un 24% menos de etanol.

En muchos vinos, después de la fermentación alcohólica llevada a cabo por la levadura *S. cerevisiae*, suele tener lugar la fermentación maloláctica, que consiste en la descarboxilación del ácido málico en ácido láctico por acción de la enzima maloláctica de las bacterias lácticas presentes en el vino. Esta transformación resulta de gran importancia porque reduce la acidez del vino, sin embargo, en ocasiones, el bajo desarrollo de estas bacterias en el vino provoca fermentaciones malolácticas incompletas. Para evitar estos inconvenientes se han diseñado cepas vínicas capaces de llevar a cabo la fermentación maloláctica, simultáneamente con la fermentación alcohólica. Estas cepas sobreexpresan el gen de la enzima maloláctica de *Lactococcus lactis* (Bony *et al.* 1997) o de *Pediococcus damnosus* (Bauer *et al.* 2005) junto con la permeasa de ácido málico de *Schizosaccharomyces pombe*.

Durante la fermentación, *S. cerevisiae* metaboliza la arginina, uno de los aminoácidos mayoritarios en el vino, generando ornitina y urea como producto. Las levaduras vínicas no metabolizan completamente la urea durante la fermentación, de modo que esta es liberada al vino. En el vino, la urea reacciona espontáneamente con el etanol para formar etil carbamato, un compuesto potencialmente carcinogénico en humanos. Coulon *et al.* (2006) construyeron una levadura vínica que expresa el gen *DUR1,2* (implicado en el metabolismo de la urea), y consiguiendo reducir la concentración de etil carbamato en el vino hasta en un 89,1%.

Determinadas transformaciones que tienen lugar a lo largo del proceso de vinificación pueden ser optimizadas o aceleradas mediante la adición de preparados enzimáticos comerciales. Los bajos niveles de actividad enzimática encontrados bajo condiciones enológicas justifica la incorporación de enzimas producidas por microorganismos industriales. Entre las enzimas añadidas se encuentran las poligalacturonasas, pectina-lisas, celulasas, hemicelulasas y algunas glicosidasas, que se han empleado para mejorar el rendimiento de los procesos mediante la degradación de polisacáridos estructurales que dificultan la extracción del mosto y la clarificación y filtración de los vinos (Canal-Llauberes 1993, Colagrande *et al.* 1994, Haight *et al.* 1994). Igualmente, estos preparados enzimáticos contribuyen a la extracción de compuestos fenólicos y a la mejora de la calidad organoléptica del vino al aumentar los precursores aromáticos del mosto (Crouzet *et al.* 2000). Sin embargo, la obtención de estas enzimas es un proceso costoso, por lo que la obtención de levaduras transgénicas

que expresan este tipo de enzimas ha supuesto una alternativa más económica a los procesos de adición de enzimas exógenas en los vinos.

El perfil aromático de los vinos, junto con los productos de la fermentación, depende en gran medida de los compuestos procedentes de la uva. Dentro del conjunto de aromas varietales, los proporcionados por los monoterpenos son de los más importantes. Estos compuestos se pueden encontrar en su forma aromática, o bien como conjugados diglicósidos no volátiles que requieren de una reacción enzimática de hidrólisis para dar lugar a los productos aromáticos. Esta reacción implica la participación inicial de una apiosidasa, una arabinofuranosidasa o una ramnosidasa, dependiendo del conjugado. Posteriormente, la acción de una glucosidasa sobre el monoterpenil glucósido resultante libera el monoterpeno volátil. Muchos vinos no expresan todo su potencial aromático al quedar una proporción considerable de estos compuestos atrapados en el estado de precursores no volátiles. Se han construido varias cepas vínicas recombinantes que liberan diferentes enzimas estables implicadas en la hidrólisis de estos compuestos, y que han dado lugar a vinos con un mayor contenido en monoterpenos y un perfil aromático mejorado (Manzanares *et al.* 2003; Sánchez-Torres *et al.* 1996). Adicionalmente se han construido levaduras industriales que expresan enzimas hidrolíticas como endoglucanasas y xilanasas que liberan precursores aromáticos como consecuencia de su actividad degradativa sobre la pared de las células provenientes de la uva (Pérez-González *et al.* 1993, Pérez-González *et al.* 1996, Ganga *et al.* 1999).

Muchas levaduras industriales han sido modificadas genéticamente para mejorar el aroma secundario de los vinos. Parte de los aromas afrutados característicos de los vinos son consecuencia de los ésteres de acetato producidos durante la fermentación. Con el fin de obtener vinos con un mayor contenido en estos componentes se han construido cepas que sobreexpresan el gen *ATF1* que codifica una alcohol acetil transferasa de *S. cerevisiae*. Estas cepas que presentan el gen *ATF1* integrado en el genoma y regulado por las secuencias del promotor y terminador del gen *PGK1* (fosfoglicerato kinasa) producen cantidades de determinados ésteres volátiles entre 2 y 12 veces superiores a las producidas por las cepas control (Lilly *et al.* 2000). Resultados similares fueron obtenidos por Verstrepen *et al.* (2003b).

La contaminación con bacterias no deseadas es un riesgo que se intenta evitar a lo largo del proceso de elaboración de los vinos. Con estos fines se han utilizado bactericidas naturales de origen biológico, como las bacteriocinas, en lugar de los bactericidas químicos (Radler 1990). Sin embargo, la extrapolación de estos tratamientos a escala industrial resulta muy cara, por lo que los biotecnólogos han desarrollado alternativas más económicas basadas en el empleo de levaduras recombinantes productoras de bacteriocinas. Schoeman *et al.* (1999), desarrollaron una cepa de laboratorio capaz de secretar la pediocina de *P. acidilactici*. Para ello se clonó en un plásmido multicopia el gen *pedA* de *P. acidilactici* fusionado con la secuencia líder del factor  $\alpha$ , todo ello regulado por las secuencias promotora y terminadora del gen *ADHI* de *S. cerevisiae*.

El aroma secundario también se ha conseguido mejorar mediante la modificación genética de las levaduras vínicas. Swiegers *et al.* (2007) consiguieron aumentar hasta 25 veces la concentración de 4MMP (4-mercapto-4-metilpentanona) y 3MH (3-mercaptohexanol), dos de los compuestos aromáticos más importantes, mediante la expresión del gen *tnaA* de *E. coli*.

Por último, procesos en la elaboración del vino como la filtración, se han visto mejorados mediante la sobreexpresión del gen *PGUI*, que codifica una endopoligalacturonasa. En los vinos fermentados por estas cepas se observó una drástica reducción en los tiempos de filtrado, comparable al de vinos suplementados con enzimas pectinolíticas fúngicas (Vilanova *et al.* 2000).



# **OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO**

Considerando el impacto positivo que el aumento en la concentración de manoproteínas tiene sobre la calidad del vino, el objetivo del trabajo ha sido el de desarrollar cepas vínicas de *Saccharomyces cerevisiae*, que superproduzcan manoproteínas durante la fermentación. De este modo, el vino estará enriquecido en manoproteínas, y será más estable frente a quiebra proteica. Así, tendrá menores requerimientos de bentonita para ser estabilizado, traducándose en una mejora en la calidad del mismo. Unido a esto, el enriquecimiento de manoproteínas en el vino a través de su superproducción por parte de las levaduras, supondría una ventaja sobre el empleo de técnicas como la crianza sobre lías o el uso de aditivos enológicos.

Para la consecución de este objetivo se plantearon 2 hipótesis de trabajo. La primera es que la delección de algunos genes implicados en la síntesis y/o remodelación de la pared celular, da lugar a un incremento en la liberación de manoproteínas al medio. La segunda es que un vino fermentado por una cepa delecionada en esos genes, estará enriquecido en manoproteínas al final de la fermentación, traducándose en una mayor estabilidad proteica del mismo. Así pues, el trabajo se desarrollará en dos fases, en una primera fase el estudio se realizará en cepas de laboratorio y en la segunda con cepas vínicas:

El objetivo de la primera fase es el de identificar genes cuya delección en cepas de laboratorio de *S. cerevisiae*, da lugar a un incremento en la liberación de manoproteínas, que se traduzca en mejoras de la calidad del vino. Para ello, el plan de trabajo propuesto es el que se describe a continuación:

- Identificar aquellos genes cuya inactivación haya sido relacionada con alteraciones en la composición de la pared celular, con especial interés en los que presenten una mayor liberación de polisacáridos y/o una liberación de manoproteínas concretas.
- Estudiar la liberación de manoproteínas en cepas haploides de laboratorio delecionadas en los genes seleccionados previamente. Determinar el efecto del fondo genético sobre el fenotipo de la delección, mediante el estudio de un mismo gen delecionado en fondos genéticos diferentes.

- Estudiar el efecto de la delección en cepas diploides de aquellos genes que, en el estudio realizado con cepas haploides, resulten más interesantes desde el punto de vista de la liberación de manoproteínas. Realizar el estudio con cepas diploides delecionadas en una copia del gen (heterozigotas), y en ambas copias (homozigotas), con el objetivo de determinar la dominancia o recesividad del fenotipo asociado a la delección de los genes.
- Estudiar el efecto sobre la quiebra proteica, del material liberado por las cepas que muestren una mayor liberación de manoproteínas.

El objetivo de la segunda fase es el de construir cepas vínicas de *S. cerevisiae*, delecionadas en los genes que hayan resultado más interesantes desde el punto de vista de la liberación de manoproteínas. Para ello, el plan de trabajo propuesto es el que se describe a continuación:

- Construir cassettes de delección consistentes en un gen marcador flanqueado por secuencias de 500 pb, correspondientes a las regiones promotora y terminadora respectivamente del gen a deleccionar.
- Transformar las cepas vínicas con los cassettes de delección y verificar las delecciones en los transformantes.
- Determinar la mayor liberación de manoproteínas de las cepas de delección construidas, de igual manera que lo realizado previamente con cepas de laboratorio.
- Para aquellas cepas que hayan mostrado una mayor liberación de manoproteínas, determinar la capacidad fermentativa en mostos naturales.
- Estudiar la estabilidad proteica de los vinos fermentados, así como la dosi de bentonita necesaria para su estabilización

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

## 1. CEPAS UTILIZADAS EN EL ESTUDIO.

### 1.1 Cepas de *Escherichia coli*.

Para los experimentos de clonación, se utilizó en todos los casos la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  (*supE44*, ? *lacU169* [F80 *lacZ*?M15], *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*).

### 1.2 Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.

En el desarrollo de la tesis se usaron diferentes cepas de *S. cerevisiae*. En la primera fase del estudio se trabajó con cepas de laboratorio tanto haploides como diploides, y en la segunda fase se trabajó con cepas vínicas.

#### 1.2.1 Cepas haploides de laboratorio.

- **BY4741. Cepa usada como control.** MATa; *his3D1*; *leu2D0*; *met15D0*; *ura3D0*.

Las cepas que se nombran a continuación son isogénicas a BY4741 y tanto la cepa control como las cepas delecionadas fueron proporcionadas por Euroscarf (European *S. cerevisiae* Archive for Functional Analysis).

**FKS1-BY1** (Y05251 en Euroscarf). Cepa delecionada en ***FKS1***.

**GAS1-BY1**. (Y00897 en Euroscarf). Cepa delecionada en ***GAS1***.

**GPI71-BY1**. (Y01361 en Euroscarf). Cepa delecionada en ***GPI7***.

**YBR183w-BY1**. (Y03323 en Euroscarf). Cepa delecionada en ***YBR183w***.

**YDL231c-BY1**. (Y03928 en Euroscarf). Cepa delecionada en ***YDL231c***.

**YNL080c-BY1**. (Y07225 en Euroscarf). Cepa delecionada en ***YNL080c***.

**YOL092w-BY1**. (Y06242 en Euroscarf). Cepa delecionada en ***YOL092w***.

**KNR4-BY1**. (Y05882 en Euroscarf). Cepa delecionada en ***KNR4***.

- **FY73. Cepa usada como control.** MATa *his3*-?200 *ura3*-52. Proporcionada por la Universidad de Valencia.

**FZH**. Cepa isogénica de FY73 delecionada en el gen ***YPL133c***. MATa *his3*-?200; *ura3*-52; *YPL133C::HIS3*. Proporcionada por la Universidad de Valencia.

- **W303 1B. Cepa usada como control.** MAT a; ade2-1; can1-100; his3-11; leu2-3; 112trp1-1; ura3-1. Proporcionada por la Università degli studi di Milano.  
**GAS1-W303.** Cepa isogénica de W303 1B delecionada en el gen *GAS1*. Proporcionada por la Università degli studi di Milano.
- **FY1679-08A.** Cepa haploide derivada de FY1679 y usada como control. MATa; ura3-52; leu2D 1; trp1D63; his3D200; GAL2. Proporcionada por Euroscarf.

Las cepas que se nombran a continuación son isogénicas a derivados haploides de FY1679 y fueron proporcionadas por la Universidad Complutense de Madrid.

**GPI7-FY.** Cepa delecionada en *GPI7*.

**YDL231c-FY.** Cepa delecionada en *YDL231c*.

**YNL080c-FY.** Cepa delecionada en *YNL080c*.

**YBR133w-FY.** Cepa delecionada en *YBR133w*.

**YNL294c-FY.** Cepa delecionada en *YNL294c*.

**KNR4-FY.** Cepa delecionada en *KNR4*.

### *1.2.2 Cepas diploides de laboratorio.*

- **BY4743. Cepa usada como control.** MATa/MAT $\alpha$ ; his3D1/his3D1; leu2D0/leu2D0; met15D0/MET15; LYS2/lys2D0; ura3D0/ura3D0.

Las cepas que se nombran a continuación son isogénicas a BY4743 y tanto la cepa control como las cepas delecionadas fueron proporcionadas por Euroscarf.

**FKS1-BY2** (Y25251 en Euroscarf). Cepa delecionada en una copia de *FKS1*.

**FKS1-BY3** (Y35251 en Euroscarf). Cepa delecionada en las dos copias de *FKS1*.

**GAS1-BY2** (Y20897 en Euroscarf). Cepa delecionada en una copia de *GAS1*.

**GAS1-BY3** (Y30897 en Euroscarf). Cepa delecionada en las dos copias de *GAS1*.

**GPI7-BY2** (Y21361 en Euroscarf). Cepa delecionada en una copia de *GPI7*.

**GPI7-BY3** (Y31361 en Euroscarf). Cepa delecionada en las dos copias de *GPI7*.

**KNR4-BY2** (Y25882 en Euroscarf). Cepa delecionada en una copia de *KNR4*.

**KNR4-BY3** (Y35882 en Euroscarf). Cepa delecionada en las dos copias de *KNR4*.

### 1.2.3 Cepas vínicas.

- **Lalvin EC1118 ®. Ceba usada como control.** Ceba vínica comercializada por Lallemmand Inc (Montreal, Canada). Las cepas que se enumeran a continuación son isogénicas a Lalvin EC1118® y han sido desarrolladas en este estudio.

**EKD/2-1.** Ceba delecionada en una de las copias del gen ***KNR4***.

**EKD-13.** Ceba delecionada en las dos copias del gen ***KNR4***.

**EGD/2-1.** Ceba delecionada en una de las copias del gen ***GPI7***.

**EGD-13.** Ceba delecionada en las dos copias del gen ***GPI7***.

**EFD/2-3.** Ceba delecionada en una de las copias del gen ***FKS1***.

**EFD-31.** Ceba delecionada en las dos copias del gen ***FKS1***.

**EGASD/2-3.** Ceba delecionada en una de las copias del gen ***GAS1***.

- **T73-4. Ceba usada como control.** Ceba vínica auxótrofa para uridina derivada de T73 (Puig *et al.* 1998). Las cepas que se enumeran a continuación son isogénicas a T73-4 y han sido desarrolladas en este estudio.

**TKD/2-1.** Ceba delecionada en una de las copias del gen ***KNR4***.

**TKD-13.** Ceba delecionada en dos de las copias del gen ***KNR4***.

**TKD-123.** Ceba delecionada en las tres copias del gen ***KNR4***.

**TGD/2-1.** Ceba delecionada en una de las copias del gen ***GPI7***.

**TGD-13.** Ceba delecionada en las dos copias del gen ***GPI7***.

**TFD/2-3.** Ceba delecionada en una de las copias del gen ***FKS1***.

**TFD-31.** Ceba delecionada en dos de las copias del gen ***FKS1***.

**TGASD/2-3.** Ceba delecionada en una de las copias del gen ***GAS1***.

**TGASD-31.** Ceba delecionada en las dos copias del gen ***GAS1***.

### 1.3 Otras cepas de levadura.

***Williopsis saturnus var. mrakii*** productora de toxina K9. Proporcionada por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT 11031).

## 2. MEDIOS DE CULTIVO

La esterilización de todos los medios de cultivo se llevó a cabo en el autoclave a 121°C durante 20 minutos.

### 2.1 Medios de cultivo de levaduras.

*YPD*: Medio rico de levaduras. Composición: extracto de levadura 1% (p/v), peptona bacteriológica 2% (p/v), glucosa 2% (p/v). Para su utilización como medio sólido se añadió agar a una concentración del 2% (p/v) antes de autoclavar.

*GCY*: Medio líquido para la medida de polisacáridos. Composición: Yeast Nitrogen Base (Difco™) 0,67% (p/v), casaminoácidos 2% (p/v), glucosa 2% (p/v). Por un lado, la glucosa se disolvió en H<sub>2</sub>O en la mitad de volumen final y se esterilizó en el autoclave durante 20 minutos a 121 °C. El resto de componentes se disolvieron en el mismo volumen de H<sub>2</sub>O y se esterilizaron de la misma manera que la glucosa. Una vez esterilizados y atemperadas las dos soluciones, se mezclaron. El medio GCY no es un medio completo, de modo que es necesario suplementarlo para complementar las auxotrofías de las cepas utilizadas. Se añadió uridina a una concentración final de 0,083 g/l, a partir de una solución stock 100 veces concentrada y esterilizada por filtración.

*Mosto modelo*: Medio para levaduras vínicas. Composición: glucosa 20% (p/v), ácido málico 0,6% (p/v), ácido tartárico 0,3% (p/v), ácido cítrico 0,03% (p/v), Yeast Nitrogen Base sin aminoácidos ni sulfato amónico (Difco®) 0,17% (p/v), sulfato amónico 0,5% (p/v). La glucosa se disolvió por un lado y el resto de componentes por otro, ambos en la mitad del volumen final. El pH de la solución que contenía el resto de componentes se ajustó a 3,5 con KOH 5N. Las dos soluciones se esterilizaron en el autoclave a 121°C durante 20 minutos y una vez atemperadas se mezclaron.

*Medio SD-Ura*: Medio mínimo deficiente en uridina para la selección de levaduras transformadas con el marcador *URA3*. Composición: glucosa 2% (p/v), Yeast Nitrogen Base (Difco™) 0,67% (p/v), agar para medio mínimo 1,67% (p/v). Para el crecimiento de cepas auxótrofas, el medio estéril fue suplementado con los aminoácidos



requeridos en cada caso a partir de soluciones 100 veces concentradas y esterilizadas por filtración.

*Medio SD+PFP*: Medio mínimo para la selección de levaduras transformadas con el marcador *ARO4-OFP*. Composición: glucosa 2% (p/v), Yeast Nitrogen Base (Difco™) 0,67% (p/v), agar para medio mínimo 1,67% (p/v), L-Tirosina 0,9 g/l. Para el crecimiento de cepas auxótrofas, el medio estéril fue suplementado con los aminoácidos requeridos en cada caso a partir de soluciones 100 veces concentradas y esterilizadas por filtración. Para la preparación del medio, bs diferentes componentes se disolvieron en el 80% del volumen final y se esterizaron. Una vez atemperado el medio se le añadió el 20% de volumen final de una solución de PFP (*p*-fluoro-DL-fenilalanina) al 10% (p/v) esterilizada por filtración.

*Medio YPD+G418*: Medio para la selección de levaduras transformadas con el marcador *kanMX4*. Se preparó YPD-agar mediante el procedimiento previamente descrito. Una vez esterilizado y atemperado, se añadió una solución de G418 20 g/l esterilizada por filtración hasta una concentración final de 40 mg/l y se repartió en placas Petri. Debido a la fotolabilidad del G418, el medio se mantuvo en oscuridad hasta su utilización.

*Medio YPD+K9*: Medio para la selección de levaduras resistentes a la toxina K9. La toxina es producida por la levadura *Williopsis saturnus* var. *mrakii* (CECT 11031, previamente denominada *Hansenula mrakii* IFO 0897). La producción de la toxina se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Hong *et al.* (1994). *Williopsis saturnus* var. *mrakii* se creció en YPD tamponado con citrato sódico 50 mM a pH 4,3 durante 96 horas a 19°C y 140 rpm. Se centrifugó el cultivo para eliminar las células, el sobrenadante se esterilizó por filtración y se almacenó a 4°C hasta su utilización. Para la elaboración del medio YPD+K9 se preparó YPD líquido tamponado con citrato sódico 50 mM a pH 4,3. Se añadió agar a una concentración del 2% (p/v) y se esterilizó en el autoclave. Se repartió el medio en placas Petri y una vez secas se añadieron en cada placa 6 ml del sobrenadante del cultivo de *Williopsis saturnus* var. *mrakii* hasta su completa absorción.

*Medio YPD+BCIP:* Medio para la determinación de fenotipo autolítico. Se preparó YPD-agar y tras autoclavarlo se atemperó y se le añadió BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) (Sigma-Aldrich, España) a una concentración de 40 mg/l, a partir de una solución stock de 20 g/l esterilizada por filtración. Inmediatamente después, el medio se repartió en diferentes placas Petri.

*Mosto Sauvignon blanc:* se prensaron uvas de la variedad Sauvignon blanc y al mosto resultante se le añadió metabisulfito potásico a una concentración final de 60 mg/l. Salvo indicación expresa, el mosto se desfangó mediante centrifugación antes de ser fermentado.

## **2.2 Medios de cultivo para bacterias.**

*Medio LB:* Medio para *E. coli*. Composición: triptona 1% (p/v), extracto de levadura 0,5% (p/v), NaCl 1% (p/v). Para medio sólido se añadió agar a una concentración del 2% (p/v). Para la selección de transformantes de *E. coli* resistentes a ampicilina se añadió este antibiótico a una concentración de 100 mg/l, una vez esterilizado y atemperado el medio. Para la selección por color de transformantes recombinantes con plásmidos dotados del fragmento a del gen *LacZ* se emplearon medios sólidos LB+Ampicilina sobre los que se extendieron X-Gal e IPTG a una concentración final de 40 mg/l cada uno. El crecimiento previo de *E. coli* para la preparación de células electrocompetentes se realizó en un medio LB modificado con una concentración de cloruro sódico reducida al 0.5% (p/v).

*Medio SOC:* Medio general para bacterias utilizado en el protocolo de transformación. Composición: triptona 2% (p/v), extracto de levadura 0,5% (p/v), NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM y glucosa 20 mM.

## **3. SOLUCIONES.**

Composición y elaboración de algunas de las soluciones utilizadas en los protocolos que se describen más adelante:

*SE.* Sorbitol 1 M , EDTA 0.1 M (pH 8.0).

*TE 50:20.* Tris-HCl 50 mM (pH 7.5), EDTA 20 mM. (pH 8.0).

*TE 10:1.* Tris-HCl 10 mM (pH 7.5), EDTA 1 mM (pH 8.0).

*Tampón TAE.* Tris-HCl 40 mM (pH 7.5), ácido acético 4 M, EDTA 1 mM (pH 8.0).

*Tampón de ruptura (2x).* Tris-HCl 92 mM (pH 6.8), glicerol 147 g/l, 2 mercaptoetanol 73,5 g/l, SDS 29,4 g/l, azul de bromofenol 0,29 g/l.

*Tris-Glicina-SDS.* Tris base 3.03 g/l, glicina 14,4 g/l, SDS 1 g/l.

*Tampón de transferencia.* Tris base 3,03 g/l, glicina 14,4 g/l, metanol 200 ml/l, SDS 0,5 g/l.

*Tampón PBS-Tween.* Fosfato sódico 100 mM, NaCl 100 mM. Se ajustó el pH a 6.8 con NaOH 10 N y posteriormente se añadió Tween 20 a una concentración final del 0,1% (v/v).

*Solución de bloqueo.* BSA al 3% (p/v) disuelto en tampón PBS-Tween.

*Solución de hibridación.*  $\text{CaCl}_2$  2.5 mM,  $\text{MgCl}_2$  2.5 mM, Concanavalina A marcada con Peroxidasa 1  $\mu\text{g/ml}$ . Los componentes se disolvieron en solución de bloqueo. Se hizo un stock de Concanavalina A marcada con Peroxidasa en agua a una concentración de 0,5 mg/ml y se mantuvo a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su utilización.

#### 4. CEBADORES.

En el estudio se utilizaron dos tipos de cebadores: cebadores híbridos empleados en la construcción de cassettes de delección (tabla 1) y cebadores para la confirmación mediante PCR de la delección de genes (tabla 2).

**Tabla 1:** Cebadores empleados en la construcción de cassettes de delección

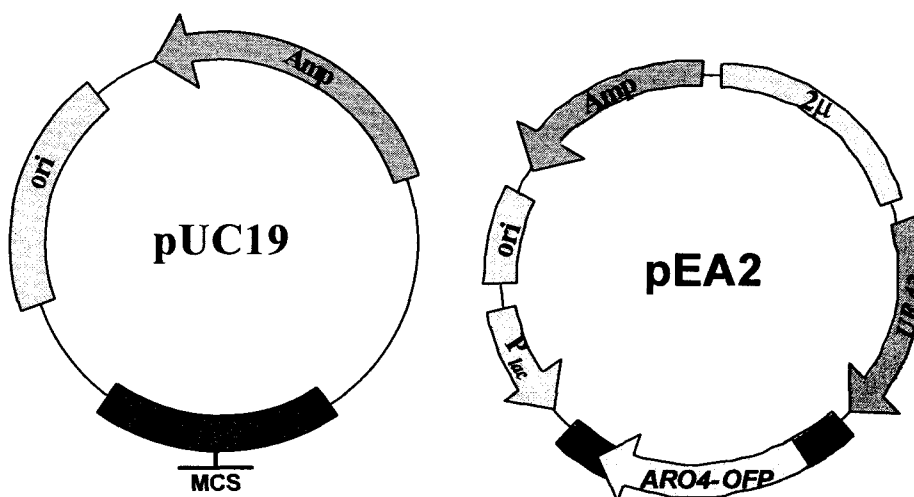
Nombre	Secuencia del oligonucleótido (5' → 3')
TKARO-f	CCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCTTGGACCACTGAGCCCTATTTG
TKARO-r	GGTACCGAGCTCGAATTCAGTGGAAATATCACAATTAACATTCTACAAC
PKARO-f	GGATCCTCTAGAGTCGACCTGCCTGCCAAGTTGTCGCCTATAGAACG
PKARO-r	GATTACGCCAAGCTTGCATGCCTGCTTCCAAAGCCCTATTGGAGGTGC
RURA3-f	TCTAGAGGATCCCCCATGGCGATTGGTAATCTCCGAACAGAAG
RURA3-r	CCAGTGAATTCGAGCTCGGTACCGGTAATAACTGATATAATTAAATTGAAGCT CTAAT
RKAN3-f	TCTAGAGGATCCCCCATGGCTATCACGAGGCCCTTTCGTC
RKAN3-r	CCAGTGAATTCGAGCTCGGTACCTCGATGATAAGCTGTCAAACATGAG
TGARO-f	CCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCATCGTGATAGTGTCATCCTC
TGARO-r	GGTACCGAGCTCGAATTCAGTGGGACAGCGATAATTGAGTGGTGG
PGARO-f	GGATCCTCTAGAGTCGACCTGCGGTGAAGTGTGCGTGGTAGATG
PGARO-r	GATTACGCCAAGCTTGCATGCCTGGTGTACGGGCTCTGTTTAC
PFKS-f	CCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCGTTTTGATGAAGCACAGGAAG
PFKS-r	GGTACCGAGCTCGAATTCAGTGGGACCGTTGTATGAAAGACTTGATTTC
TFKS-f	GGATCCTCTAGAGTCGACCTGCCAATACTTGCTTGAACGCTTGATT
TFKS-r	GATTACGCCAAGCTTGCATGCCTCAATAATGGCTGCGTAAAAATTTTG
PGAS-f	CCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCAACACCAACTTTACCTACCTTTAGGAC
PGAS-r	GGTACCGAGCTCGAATTCAGTGGCTGTGTTTGTGTTTTGTTTTATCAGAC
TGAS-f	GGATCCTCTAGAGTCGACCTGCGCTTCGACACATACATAATAACTCGATAAG
TGAS-r	GATTACGCCAAGCTTGCATGCCTGAGTCAATTGATTGAAAAATAATTGCG

**Tabla 2:** cebadores para la confirmación mediante PCR de la delección de genes.

Nombre	Secuencia del oligonucleótido (5' → 3')
PromARO4Q	CCACGGCTAATTAGGTGATCATG
TermKNR4	CGAAAACCCAATTACCATAAGC
ORFKNR4Q	CGATGATGTAAATAAGCAAACAGAAGA
ORFGPI7Q	CGGCAGCAAAAATGAAAAATTAA
TermGPI7Q	AGTTGTTGCGTTTGTTCAAAACG
CDKNR-f	ACGTGACATATGTCATTACCCTAGATTAC
CDKNR-r	GGTTCATGCTCTTCAATGTCGTTAC
CDGPI-f	CTTTTCAAGGCAATATGCTCG
CDGPI-r	TTCAAAACGATAGGCTTTTCTTGC
CDFKS-f	GAAATAGTCTCACTTACTGGGCGAC
CDFKS-r	CTGAAGAGCCATGAGACAATTGC
CDGAS-f	CAACAACGATACTGGTCCAAATG
CDGAS-r	CTGACAAAGAAGCTGCCTCATTC

## 5. VECTORES

En el estudio se utilizaron varios plásmidos. El plásmido pUC19 (figura 7) se utilizó para clonar en él los diferentes elementos de los cassettes de delección. pEA2 (figura 7) se digirió con las enzimas *SacI* y *BamHI* para extraer el gen *ARO4-OFP*. El plásmido pITGPCR3 diseñado por Tabera *et al.* (2006) se utilizó como molde para la amplificación por PCR del gen marcador *kanMX4*.



**Figura 7:** Mapa de algunos plásmidos utilizados en el estudio. MCS (Multiple Cloning Site o lugar múltiple de clonaje) es una región dentro del gen *LacZα* en la que se encuentran varias dianas de restricción y por lo tanto es un punto donde clonar fragmentos de DNA mediante el sistema digestión/ligación.

## 6. MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

### 6.1 Extracción de DNA genómico de *S. cerevisiae*.

Las cepas de *S. cerevisiae* se crecieron en YPD líquido a 30°C y 140 rpm, y se extrajo su gDNA siguiendo el método descrito por Querol *et al* (1992). Los cultivos se centrifugaron durante 5 minutos a 13.000 rpm en una centrífuga de mesa Hettich Mikro 12-24 y tras eliminar el sobrenadante, las células se lavaron con 1 ml de H<sub>2</sub>O destilada. Las células lavadas se resuspendieron en 500 µl de SE y se les añadieron 20 µl de una solución de Zimoliasa-20T de 10 mg/ml. Se incubaron durante 2 horas a 37°C. Transcurrido ese tiempo se centrifugaron durante 3 minutos en centrífuga de mesa a

13.000 rpm y el *pellet* se resuspendió en 500 µl de tampón TE 50:20. Se añadieron 10 µl de SDS 20% (p/v) y tras mezclar los tubos por inversión se incubaron a 65°C durante 30 minutos. Se les añadieron 200 µl de AcK 5M mantenido a -20°C (Sambrook *et al.* 1989) y se incubaron en hielo durante 5 minutos. Se centrifugaron los tubos, se recogió el sobrenadante y se añadió a otro tubo que contenía 650 µl de isopropanol. Se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó 5 minutos a 13.000 rpm en centrífuga de mesa. Los precipitados se lavaron con 500 µl de etanol/H<sub>2</sub>O 70% y tras dejarlos secar se resuspendieron en 50 µl de TE 10:1 con 50 µg/ml de RNasa.

## **6.2 Extracción de DNA plasmídico de *E. coli*.**

Para la extracción de DNA plasmídico de *E. coli* se utilizó el sistema comercial “High Pure Plasmid Isolation Kit” (Roche), siguiendo las instrucciones del fabricante.

En algunos casos se requirió un método rápido de extracción de plásmidos con el fin de localizar rápidamente clones recombinantes poco frecuentes. Para ello se utilizó el protocolo de minipreparación de plásmidos a partir de colonias. La extracción del DNA plasmídico se realizó a partir de una estría en una placa de medio sólido. Se tomó una parte de la estría con un palillo y se resuspendió en 20 µl de una solución que contenía 0,5 mg/ml de lisozima (Roche), EDTA 25 mM pH 8, Tris HCl 25 mM pH 7.5, 0,1 mg/ml de RNasa A, 0,02% (p/v) de azul de bromofenol y 0,015% (v/v) de glicerol. Se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos, se añadieron 5 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se mezcló vigorosamente. Se centrifugó (13800 x g) durante 2 minutos. Se tomaron 10 µl de la fase acuosa para realizar una electroforesis en un gel de agarosa al 0,7% (p/v).

## **6.3 Electroforesis de DNA en geles de agarosa.**

La separación y visualización de fragmentos de DNA se realizó mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa al 0.7% (p/v) sumergidos en tampón TAE. Para la migración del DNA se aplicó un voltaje de 5 V/cm y el patrón utilizado fue DNA de fago  $\phi$  digerido con las enzimas de restricción *HindIII* y *EcoRI*. Para la visualización de las bandas de DNA los geles fueron teñidos durante 15-20 minutos en

una solución de bromuro de etidio (5  $\mu\text{g/ml}$ ) e irradiados con luz ultravioleta ( $\lambda=312\text{ nm}$ ) en un transiluminador.

El aislamiento de DNA migrado en geles de agarosa se realizó mediante el sistema comercial “QIAquick Gel Extraction Kit” (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### **6.4 Digestión de DNA.**

Las digestiones de DNA con endonucleasas de restricción (1 U/ $\mu\text{g}$ ) se llevaron a cabo durante un tiempo de entre 3 horas hasta toda la noche, a la temperatura apropiada para cada enzima y utilizando el tampón recomendado por el fabricante.

#### **6.5 Ligación de fragmentos de DNA.**

La ligación de fragmentos de DNA se llevó a cabo con la enzima T4 DNA ligasa (New England Biolabs). La reacción se realizó en un volumen de 10  $\mu\text{l}$  utilizando 0.4 U de enzima y el tampón proporcionado por el fabricante. Las mezclas de ligación se incubaron a 16°C durante toda la noche.

#### **6.6 Amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR.**

Para la amplificación de secuencias de DNA mediante PCR se utilizaron, en función del fragmento a amplificar, dos DNA polimerasas diferentes. Para la construcción y amplificación de cassettes de delección se utilizó la enzima Pfu-Turbo® (Stratagene) mientras que para el análisis de los transformantes se utilizó la enzima AmpliTaq-Gold® (Applied Biosystems). En el primer caso, las mezclas de reacción contenían el DNA molde para la reacción, una pareja de oligonucleótidos cebadores a una concentración de 0,5  $\mu\text{M}$  cada uno, el tampón proporcionado por el proveedor, desoxinucleótidos trifosfato (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) a una concentración de 0,1 mM cada uno y 2,5 U de la enzima. El volumen final de la mezcla de reacción fue de 50  $\mu\text{l}$ . Antes de la adición de la enzima se realizó un tratamiento desnaturalizante de la muestra a 95°C durante 5 minutos. De este modo se evita la elongación de fragmentos como resultado de una unión inespecífica de los oligonucleótidos, debido a que la

enzima se encuentra en su forma activa. La temperatura de hibridación fue en todos los casos de 55°C y el tiempo de elongación a 68°C dependió del tamaño del fragmento a amplificar (aproximadamente 1 minuto/kilobase). Las fases de desnaturalización, hibridación y elongación se repitieron durante 35 ciclos. Tras la culminación de la fase de elongación del último ciclo se incubaron las muestras a 68°C durante 10-15 minutos para permitir la terminación de las cadenas que hubieran quedado incompletas en los ciclos anteriores.

El tampón de reacción de la enzima AmpliTaq Gold®, a diferencia del de Pfu-Turbo®, no contiene  $MgCl_2$  (esencial para la elongación), de modo que fue necesario añadirlo a la mezcla de reacción a una concentración de 2,5 mM. Al hacer la mezcla de reacción la enzima se añadió junto con el resto de componentes, ya que a diferencia de Pfu-Turbo®, AmpliTaq Gold® se encuentra en una forma inactiva y solamente se activa una vez alcanzados los 95°C. De este modo, no existe el riesgo de amplificaciones inespecíficas antes de alcanzar esa temperatura. La temperatura de hibridación fue siempre de 55°C mientras que la de elongación fue de 72°C. El tiempo de elongación dependió del tamaño del fragmento a amplificar (aproximadamente 0,5 minutos/kilobase).

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400 y el resultado de las reacciones se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa.

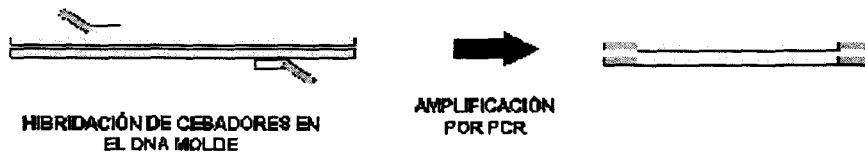
#### **6.7 Clonación de fragmentos en plásmidos mediante la técnica descrita por Geiser *et al.* (2001).**

La técnica descrita por Geiser *et al.* (2001) se basa en la amplificación por PCR del fragmento que se desea clonar y su posterior inserción en un plásmido. Para ello se utilizan cebadores que constan de una parte que hibrida con el fragmento a clonar y otra que hibrida con la región del plásmido donde se va a insertar. En una primera reacción se amplifica el fragmento a clonar por PCR usando la enzima Pfu (figura 8). El resultado es el fragmento flanqueado por regiones que hibridan con el plásmido donde se va a clonar. En una segunda reacción de amplificación, el plásmido actúa como DNA molde y el fragmento amplificado actúa como cebador al hibridar con el plásmido por

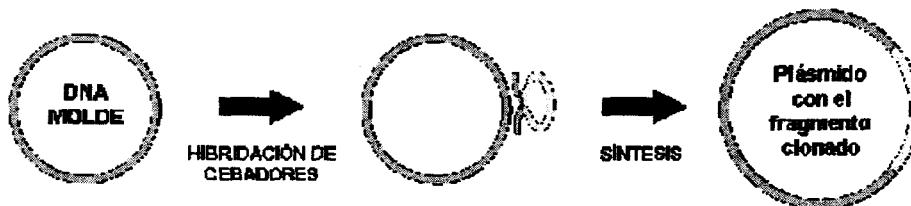


las regiones complementarias al mismo. Durante la reacción se amplifica el plásmido y el resultado es un plásmido que lleva clonado el fragmento previamente amplificado. Finalizada la reacción, en la mezcla habrá plásmidos que hayan integrado el fragmento pero también plásmidos que no lo hayan integrado. Los plásmidos que han integrado el fragmento se han sintetizado *in vitro* mientras que los que no lo llevan, se han sintetizado *in vivo* y sus secuencias están metiladas. Para eliminar estos últimos se digiere la mezcla con la enzima de restricción *DpnI*, que reconoce y digiere solamente secuencias metiladas dejando intactas aquellas que no lo están. Una vez realizada la digestión, se transforma *E. coli* DH5a con la mezcla de reacción, verificándose posteriormente la inserción del fragmento por tamaño y/o secuenciación.

#### AMPLIFICACIÓN POR PCR DEL FRAGMENTO A CLONAR



#### INSERCIÓN EN UN PLÁSMIDO



**Figura 8:** Clonación de un fragmento de DNA amplificado por PCR en un plásmido mediante la técnica descrita por Geiser *et al.* (2001).

#### 6.8 Construcción de cassettes de delección.

Los cassettes de delección se construyeron mediante la técnica descrita por Geiser *et al.* (2001), flanqueando un gen marcador con secuencias de alrededor de 500 pares de bases correspondientes al promotor y terminador del gen a deleccionar. De este modo, al

transformar *S. cerevisiae* con el cassette de delección, éste se integrará por recombinación homóloga en el *locus* del gen a deleccionar y el resultado dará lugar a la ORF del gen reemplazada por el gen marcador.

Para la construcción de las cepas industriales delecionadas se utilizaron tres marcadores de selección diferentes, *ARO4-OFP* y *kanMX4* (en todos los genes deleccionados), y *URA3* (para la delección de la tercera copia de los genes *KNR4* y *FKS1* presente en la cepa T73-4). En primer lugar se clonó *ARO4-OFP* en el plásmido bacteriano pUC19 (figura 7). *ARO4-OFP* se aisló del plásmido pEA2 (figura 7) (Cebollero *et al.* 2004) mediante su digestión con las enzimas de restricción *SacI* y *BamHI*, y se insertó por ligación en pUC19 digerido con las mismas enzimas. El plásmido resultante se denominó pUCARO (figura 9).

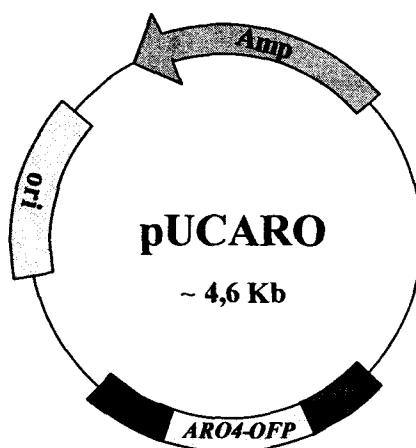
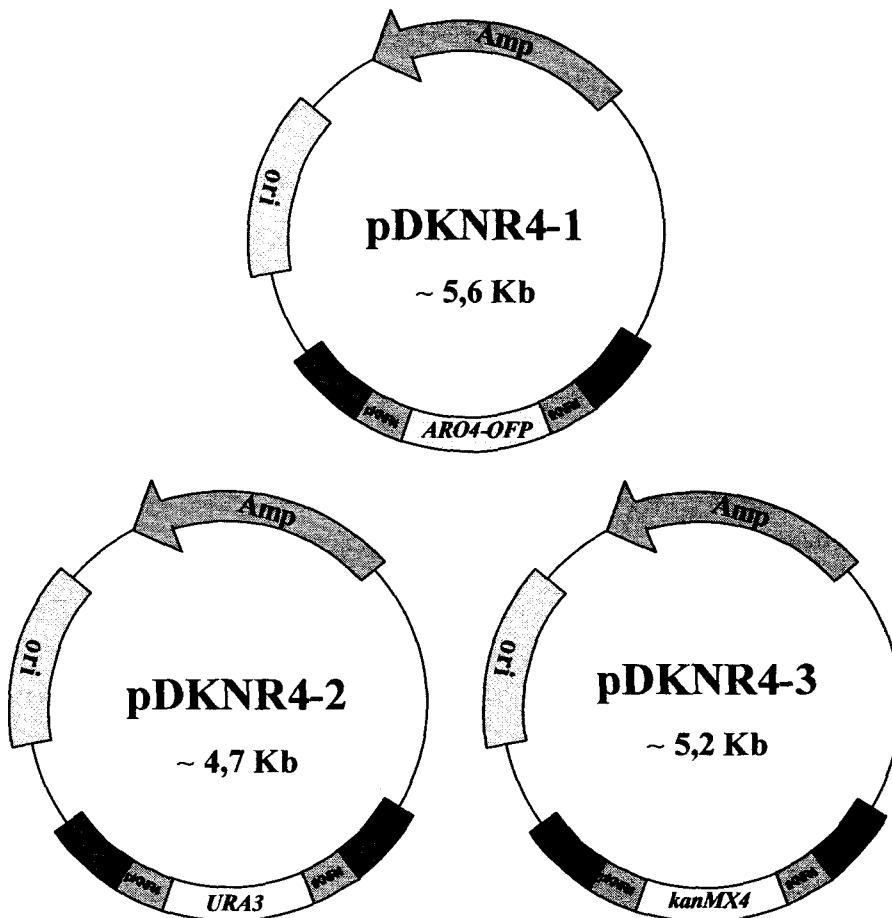


Figura 9: Mapa del plásmido pUCARO.

Los cassettes de delección para los diferentes genes se construyeron como se describe a continuación.

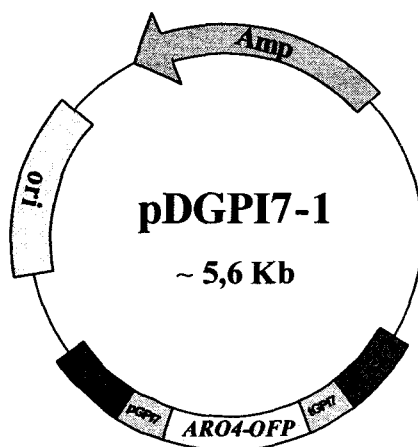
- ***KNR4***: Las regiones promotora y terminadora de *KNR4* se amplificaron por PCR con los pares de cebadores PKARO-f/ PKARO-r y TKARO-f/ TKARO-r respectivamente (tabla 1). Estos dos insertos se clonaron secuencialmente en pUCARO mediante la técnica descrita por Geiser *et al.* (2001) y el plásmido resultante se denominó pDNKR4-1 (figura 10). El gen marcador *URA3* se amplificó por PCR con el par de cebadores RURA-f/RURA-r (tabla 1) usando

DNA genómico de la cepa EC1118 como molde y se clonó en pDKNR4-1 mediante la misma técnica, reemplazando el gen *ARO4-OFP*. El plásmido resultante se denominó pDKNR4-2 (figura 10). Finalmente el gen marcador *kanMX4* se amplificó por PCR con el par de cebadores RKAN3-f/RKAN-r (tabla 1) usando el plásmido pITGPCR3 como molde (Tabera *et al.* 2006) y se clonó sobre pDKNR4-1 de igual manera que *URA3*, reemplazando el gen marcador. El plásmido resultante se denominó pDKNR4-3 (figura 10).



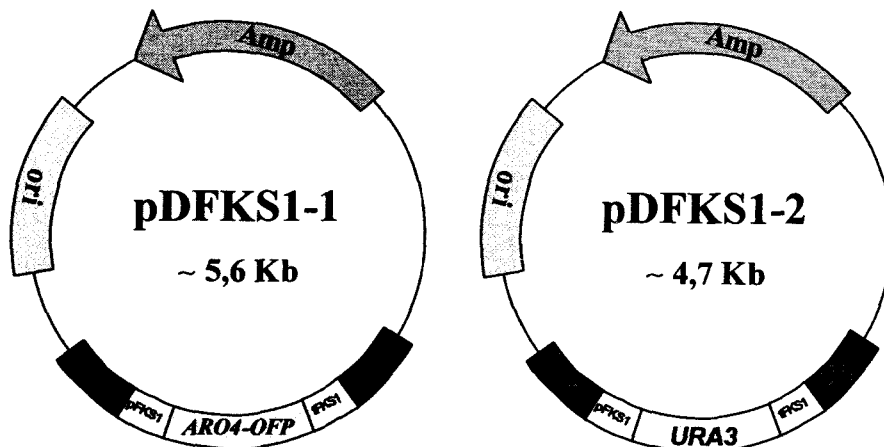
**Figura 10:** Mapa de los plásmidos pDKNR4-1, pDKNR4-2 y pDKNR4-3, que contienen los cassettes de delección DKNR4-1, DKNR4-2 y DKNR4-3 respectivamente.

- GPI7: Las regiones promotora y terminadora de GPI7 se amplificaron por PCR con los pares de cebadores PGARO-f/ PGARO-r y TGARO-f/ TGARO-r respectivamente (tabla 1). Se clonaron secuencialmente en pUCARO para dar lugar al plásmido pDGPI7-1 (figura 11).



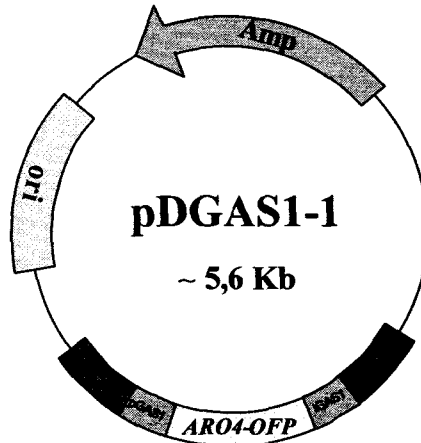
**Figura 11:** Mapa del plásmido pDGPI7-1 que contiene el cassette de delección DGPI7-1.

- ***FKS1***: Las regiones promotora y terminadora de *FKS1* se amplificaron por PCR con los pares de cebadores PFKS-f/ PFKS-r y TFKS-f/ TFKS-r respectivamente (tabla 1). Se clonaron secuencialmente en pUCARO para dar lugar al plásmido pDFKS1-1 (figura 12). El gen marcador *URA3* se amplificó por PCR con el par de cebadores RURA-f/RURA-r (tabla 1) usando DNA genómico de la cepa EC1118 como molde y se clonó en pDFKS1-1 mediante la misma técnica, reemplazando el gen *ARO4-OFP*. El plásmido resultante se denominó pDFKS1-2 (figura 12).



**Figura 12:** Mapa de los plásmidos pDFKS1-1 y pDFKS1-2 que contienen los cassettes de delección DFKS1-1 y DFKS1-2 respectivamente.

- GAS1: Las regiones promotora y terminadora de FKS1 se amplificaron por PCR con los pares de cebadores PGAS-f/ PGAS-r y TGAS-f/ TGAS-r respectivamente (tabla 1). Se clonaron secuencialmente en pUCARO para dar lugar al plásmido pDGAS1-1 (figura 13).



**Figura 13:** Mapa del plásmido pDGAS1-1 que contiene el cassette de delección DGAS1-1.

Para la delección de los genes *GPI7*, *FKS1* y *GAS1* mediante el marcador de selección *kanMX4*, no se construyó un cassette de delección. En su lugar, se utilizó como molde el DNA genómico de cepas ya delecionadas en esos genes con el marcador *kanMX4*, y procedentes de la colección Euroscarf.

En la tabla 3 se muestra un resumen de los diferentes cassettes de delección empleados para la construcción de las cepas vínicas delecionadas en los genes *KNR4*, *GPI7*, *FKS1* y *GAS1*.

**Tabla 3:** Cassettes de delección utilizados para deleccionar cada copia de los diferentes genes, marcador de selección que contienen, y DNA molde y pareja de cebadores utilizados para su amplificación por PCR.

Gen a deleccionar	Cassette de delección	Marcador de selección	DNA molde	Pareja de cebadores
<i>KNR4</i>	DKNR4-1	<i>ARO4-OFP</i>	pDKNR4-1	TKARO-f / PKARO-r
	DNKR4-2	<i>URA3</i>	pDKNR4-2	
	DKNR4-3	<i>KanMX4</i>	pDKNR4-3	
<i>GPI7</i>	DGPI7-1	<i>ARO4-OFP</i>	pDGPI7-1	TGARO-f / PGARO-r
	DGPI7-3	<i>KanMX4</i>	gDNA GPI7-BY1	
<i>FKS1</i>	DFKS1-1	<i>ARO4-OFP</i>	pDFKS1-1	PFKS-f / TFKS-r
	DFKS1-2	<i>URA3</i>	pDFKS1-2	
	DFKS1-3	<i>KanMX4</i>	gDNA FKS1-BY1	
<i>GAS1</i>	DGAS1-1	<i>ARO4-OFP</i>	pDGAS1-1	PGAS-f / TGAS-r
	DGAS1-3	<i>KanMX4</i>	gDNA GAS1-BY1	

## 7. MÉTODOS DE TRANSFORMACIÓN DE MICROORGANISMOS

### 7.1 Transformación genética de *E. coli* por electroporación.

La transformación de *E. coli* DH5a se realizó mediante electroporación (Sambrook *et al.* 1989). La primera fase de este método consiste en la preparación de células electrocompetentes. Para ello, a partir de 10 ml de un cultivo de *E. coli* DH5a crecido en LB durante toda la noche, se inoculó 1 l de LB modificado (ver medios de cultivo). Cuando este cultivo alcanzó unos valores de DO<sub>600</sub> de 0.5-0.7, las células fueron recogidas por centrifugación en frío (4°C) a 4000 x g durante 15 minutos y resuspendidas en 1 l de una solución de glicerol al 10% (v/v), previamente mantenida en hielo. El procedimiento se repitió tres veces, resuspendiendo las células sucesivamente en 500, 250 y 3 ml de glicerol al 10% (v/v) frío. A partir de esta suspensión se dispensaron, manteniendo las condiciones de esterilidad y baja temperatura, alícuotas de 40 µl de electrocompetentes que se conservaron a -70°C.

Para la transformación de *E. coli* se añadieron 2 µl de la solución del DNA de interés a 40 µl de electrocompetentes recientemente descongeladas y mantenidas en hielo. Esta mezcla fue depositada entre los electrodos de una cubeta estéril de electroporación enfriada previamente en hielo. La cubeta, con una distancia entre electrodos de 0,2 cm, se colocó en el electroporador y se sometió a una descarga eléctrica de 2,5 kV durante 5 milisegundos aproximadamente. Inmediatamente después la muestra se diluyó en 1 ml de SOC y se incubó durante 1 hora a 37°C, permitiendo la expresión del gen de resistencia a ampicilina en las células transformadas. La mezcla de transformación se inoculó en una placa de LB+Ampicilina, aislándose colonias de transformantes resistentes a este antibiótico después de 24 horas de incubación a 37°C.

El empleo en este trabajo del vector pUC19, portador del fragmento *LacZ* con su secuencia reguladora, permitió la selección por color, en un medio LB+Ampicilina en presencia de IPTG y X-Gal. IPTG es un inductor de la expresión del gen *LacZ* (que codifica para la β-galactosidasa) y X-Gal es un sustrato de la β-galactosidasa que al ser catalizado por la misma da lugar a un compuesto de color azul. Al transformar *E. coli* con pUC19 y crecer las células en medio LB+Ampicilina en presencia de IPTG y X-Gal, las colonias procedentes de las células transformadas se teñirán de color azul como

consecuencia de la actividad  $\beta$ -galactosidasasobre el X-Gal (Horwitz *et al.* 1964). Sin embargo, si el fragmento del gen LacZ presente en pUC19 se encuentra interrumpido por la clonación de un fragmento de DNA en el MCS, no se expresará una forma activa de la  $\beta$ -galactosidasa, dando como resultado colonias blancas en el medio LB+Ampicilina en presencia de IPTG y X-Gal.

## **7.2 Transformación genética de *S. cerevisiae*.**

Para la transformación de las cepas de *S. cerevisiae* se siguió el protocolo descrito por Ito *et al.* (1983). Se inocularon 50 ml de YPAD hasta una densidad de  $10^6$  cel/ml con un precultivo de levaduras crecidas durante la noche anterior. Cuando el cultivo alcanzó una concentración celular de  $2 \times 10^7$  células/ml las células se recogieron por centrifugación a  $3000 \times g$  y se lavaron, bajo condiciones estériles, con 25 ml de agua destilada y posteriormente con 1 ml de LiAc 100 mM. Las células finalmente se resuspendieron en LiAc 100 mM hasta una densidad de  $2 \times 10^9$  cel/ml. Para proceder a la transformación, sobre una alícuota de 50  $\mu$ l, con aproximadamente  $10^8$  células, se añadieron en el siguiente orden, 240  $\mu$ l de PEG al 50% (p/v), 36  $\mu$ l de LiAc 1 M, 10  $\mu$ l de DNA de cadena sencilla procedente de esperma de salmón (SS-DNA 10 mg/ml) hervido durante 5 minutos y enfriado en hielo, 20  $\mu$ l del DNA de interés y 54  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O. Una vez resuspendidas las células por agitación, se incubaron durante 30 minutos a 30°C y posteriormente se las sometió a un choque térmico de 42°C durante otros 30 minutos. Las células recogidas por centrifugación a  $4500 \times g$  durante 15 segundos se resuspendieron en 1 ml de agua destilada estéril. Dependiendo del criterio de selección empleado para el aislamiento de las colonias transformantes, la suspensión de células se sembró directamente en placas de medio selectivo o bien se incubó en medio YPD durante un tiempo determinado para permitir que los transformantes expresaran el fenotipo de resistencia antes, de someter a las células a la presión selectiva. Las placas con medio los medios selectivos se incubaron a 30°C durante 2-5 días.



## 8. DELECIÓN DE GENES EN CEPAS VÍNICAS DE *S. cerevisiae*.

### 8.1 Transformación.

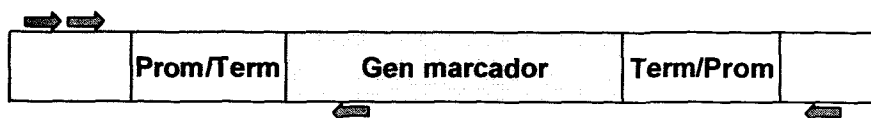
Para la construcción de cepas vínicas de *S. cerevisiae* delecionadas en los genes *KNR4*, *GPI7*, *FKS1* y *GAS1*, se usaron dos cepas diferentes: EC1118 y T73-4 (auxótrofa para uridina). Los diferentes cassettes de delección fueron amplificados por PCR tal y como se describe en la tabla 3.

La transformación de las cepas con los cassettes de delección se llevó a cabo mediante el método descrito en el apartado anterior. Brevemente, las cepas de levadura fueron transformadas con 20 µl de la reacción de amplificación por PCR del cassette de delección correspondiente. Para los cassettes con el marcador de selección *ARO4-ORF*, tras la transformación, las células se diluyeron 10 veces en YPD y se incubaron durante 17 horas a 30°C y 140 rpm para permitir la expresión del gen de resistencia antes de aplicar la presión selectiva. Los transformantes se seleccionaron tras 5 días de incubación a 30°C en placas de SD+PFP. Para los cassettes con el marcador de selección *KanMX4*, las células se diluyeron 2 veces en YPD y se incubaron a 30°C y 200 rpm para permitir la expresión del gen de resistencia. Los transformantes se seleccionaron tras dos días de incubación a 30°C en placas de YPD+G418. Finalmente, para el marcador *URA3* los transformantes se seleccionaron tras dos días de incubación a 30°C en placas de SD sin uridina. Los fenotipos de los transformantes se confirmaron por réplica en placa con los mismos medios de selección utilizados.

### 8.2 Análisis de los transformantes.

Los transformantes se crecieron en YPD líquido a 30°C y 140 rpm hasta alcanzar la fase estacionaria. Se extrajo su gDNA mediante el método descrito por Querol *et al.* (1992), descrito anteriormente. La integración de los cassettes de delección en los *loci* correspondientes se analizó mediante PCR a tiempo real ABI Prism 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems) y/o PCR convencional. El análisis se realizó como se describe a continuación:

- KNR4:** La integración del cassette DKNR4-1 se analizó por PCR en tiempo real ABI Prism 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems). Los cebadores usados para ello fueron PromARO4Q y TermKNR4Q (tabla 2) que hibridan en el promotor de *ARO4-OFP* y downstream del terminador de *KNR4* respectivamente (figura 14). De este modo, solamente es posible la amplificación en el caso de haberse insertado en el *locus KNR4* y haberse reemplazado la ORF por *ARO4-OFP*. Para comprobar el buen funcionamiento de los cebadores se realizó un control positivo amplificando con el par de cebadores ORFKNR4Q y TermKNR4Q, y TGARO-f y PromARO4Q respectivamente (tabla 2). En el primer caso se utilizó como molde gDNA de EC1118 y se amplifica la región 3' de la ORF de *KNR4* así como su terminador. En el segundo caso se utilizó como molde el plásmido pDGPI7-1 y se amplifica la región promotora de *GPI7* y la región 5' de la ORF de *ARO4-OFP*. La correcta inserción del cassette fue adicionalmente confirmada por la amplificación por PCR de todo el *locus* usando los cebadores CDKNR-f y CDKNR-r (tabla 2), y verificación del tamaño del amplicón por electroforesis en gel de agarosa. La inserción del resto de marcadores de selección fue analizada directamente de esta última forma.



**Figura 14:** Análisis de la delección de los diferentes genes mediante PCR. Las flechas rojas indican los lugares de hibridación de los cebadores empleados en la PCR a tiempo real, y las flechas azules los de los cebadores empleados en la PCR convencional. Prom: promotor del gen delecionado. Term: terminador del gen delecionado.

- GPI7:** Al igual que con *KNR4*, la integración del cassette DGPI7-1 se analizó por PCR en tiempo real ABI Prism 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems). Los cebadores usados para ello fueron PromARO4Q y TermGPI7Q (tabla 2) que hibridan en el promotor de *ARO4-OFP* y downstream del terminador de *GPI7* respectivamente. El control positivo se realizó amplificando con el par de cebadores ORFGPI7Q y TermKNR4Q, y TGARO-f y PromARO4Q respectivamente (tabla 2). En el primer caso se utilizó como molde gDNA de EC1118 y se amplifica la región 3' de la ORF de *GPI7* así como su terminador. En el segundo caso se realizó tal y como se describe en el

apartado anterior. La correcta inserción del cassette se determinó amplificando el *locus GPI7* con los cebadores CDGPI-f y CDGPI-r (tabla 2), y los tamaños de los amplicones fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa.

- ***FKS1***: El *locus FKS1* se amplificó con los cebadores CDFKS-f y CDFKS-r (tabla 2), y los tamaños de los amplicones fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa.
- ***GAS1***: El *locus GAS1* se amplificó con los cebadores CDGAS-f y CDGAS-r (tabla 2), y los tamaños de los amplicones fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa.

## 9. MEDIDA DE LA LIBERACIÓN DE POLISACÁRIDOS.

### 9.1 Condiciones de cultivo.

A partir de una colonia aislada en placa, se inocularon precultivos de las levaduras en medio GCY debidamente suplementado y se incubaron a 30°C y 140 rpm durante 24 horas. A partir de éstos se inocularon matraces Erlenmeyer con 50 ml de medio GCY debidamente suplementado, a una  $DO_{600}$  de 0,1 y se incubaron a 30°C y 140 rpm. El crecimiento de los cultivos se siguió midiendo su  $DO_{600}$  hasta que ésta permaneció constante (al alcanzar la fase estacionaria). Llegado este momento se centrifugaron los cultivos para separar las células y recoger los sobrenadantes.

### 9.2 Aislamiento de la fracción macromolecular presente en los sobrenadantes.

Para el aislamiento de la fracción macromolecular presente en los sobrenadantes se utilizaron dos sistemas, la precipitación con etanol ó la cromatografía de exclusión molecular.

Para la precipitación con etanol, a cada ml de sobrenadante se le añadieron 5 ml de etanol absoluto y 50  $\mu$ l de HCl 1N. Tras una incubación durante 18 horas a temperatura ambiente, se centrifugaron a 13.000 rpm en una centrífuga de mesa Hettich

Mikro 12-24, durante 20 minutos y los precipitados se lavaron dos veces con etanol al 85%. Finalmente estos precipitados se secaron en la estufa de 37°C, se resuspendieron en 1 ml de H<sub>2</sub>O.

Para el aislamiento de los polisacáridos mediante cromatografía se utilizaron columnas Econo-Pac 10DG® (Bio-Rad). Siguiendo las instrucciones del fabricante, se pasó 1 ml de sobrenadante a través de las columnas, se eluyó con H<sub>2</sub>O y la fracción macromolecular se recogió en 1,5 ml de eluido. Para regenerar las columnas se pasó a través de ellas 20 ml de H<sub>2</sub>O, y para su almacenamiento se mantuvieron con una solución de azida sódica al 0,02%.

### 9.3 Cuantificación de polisacáridos totales. Método del fenol/sulfúrico.

Para la cuantificación de los polisacáridos presentes en la fracción macromolecular de los sobrenadantes se siguió el protocolo descrito por Segarra *et al.* 1995, con varias modificaciones. Se hicieron 5 alícuotas de 200 µl a partir del volumen recogido en la cromatografía de exclusión molecular (solución que contiene la fracción macromolecular de los sobrenadantes de los cultivos en GCY) y a cada alícuota se le añadieron 200 µl de una solución de fenol al 5% (p/v). Se añadió posteriormente 1 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (95-98% (v/v)) y se agitó vigorosamente en el Vortex hasta homogeneizar la mezcla. Los tubos se incubaron en un baño hirviendo durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación se enfriaron rápidamente en hielo y una vez atemperados se midió la absorbancia a 490 nm. La manosa es el componente mayoritario de la fracción polisacáridica de las manoproteínas (98% de manosa frente a 2% de glucosa). Para tener en cuenta el efecto de la hidrólisis de los polisacáridos en la reacción con el fenol/sulfúrico, se utilizó manano para construir una recta patrón. La ecuación de la recta patrón obtenida y que se utilizó en los cálculos posteriores es la siguiente:

$$[manano] \text{ mg/l} = (Abs \ 490nm - 0.01129) / 0.00913$$

Los valores de concentración de polisacárido se expresaron así como equivalentes en manano. Los datos se analizaron estadísticamente mediante ANOVA de una vía y test de Dunett para la comparación de las medias de los mutantes respecto a los valores obtenidos por su respectiva cepa control. Además, para establecer

comparaciones entre los valores medios obtenidos entre las diferentes cepas se usó el análisis DMS. Para ello se utilizó el programa informático SPSS 13.0 y se consideraron resultados significativamente diferentes para valores de  $p < 0.05$ .

## **10. DETECCIÓN DE MANOPROTEÍNAS.**

La detección de las manoproteínas se llevó a cabo mediante su hibridación con Concanavalina A marcada con Peroxidasa. La Concanavalina A es una lectina que se une específicamente a polímeros que contienen glucosa y manosa unidos mediante un enlace  $\alpha$ . Por lo tanto la determinación de las manoproteínas se llevó a cabo mediante la hibridación con la fracción de manano. El método utilizado no es cuantitativo, pero sí permite establecer diferencias entre concentraciones diferentes de manoproteínas y sirve de complemento para la información cuantitativa obtenida mediante el método fenol/sulfúrico.

### **10.1 Electroforesis de proteínas SDS-PAGE.**

Las proteínas contenidas tanto en los sobrenadantes de cultivos en GCY como en los vinos fermentados por las cepas del estudio se separaron mediante una electroforesis desnaturizante SDS-PAGE en un gel a una concentración del 10% de poliacrilamida (Laemli 1970). A 10  $\mu$ l de muestra se le añadieron otros 10  $\mu$ l de tampón de ruptura 2x, y la mezcla se incubó durante 5 minutos en un baño hirviendo. Se cargaron los 20  $\mu$ l de la mezcla en los pocillos del gel y se aplicó un voltaje de 120 V. Como patrón de peso molecular se utiliza el patrón preteñido “prestained SDS-PAGE standards” de la casa comercial Bio-Rad. La electroforesis se llevó a cabo en el tampón Tris-glicina-SDS.

### **10.2 Electrotransferencia.**

Las proteínas migradas en el gel de poliacrilamida se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa mediante electrotransferencia usando el sistema Mini Protean® (Bio-Rad), siguiendo las instrucciones del fabricante. La electrotransferencia se llevó a cabo en tampón de transferencia a un voltaje de 30 V y a una temperatura de

4°C para evitar el sobrecalentamiento del sistema. La membrana con las proteínas ya transferidas se secó en la estufa a 37°C durante 30 minutos.

### **10.3 Hibridación con Concanavalina A marcada con Peroxidasa.**

Una vez seca la membrana se procedió a desarrollar el protocolo de hibridación con Concanavalina A marcada con Peroxidasa siguiendo el método descrito por Klis *et al.* (1998). La membrana se incubó durante una hora con solución de bloqueo. Se hicieron dos lavados de 5 minutos con tampón PBS-Tween20. Se incubó la membrana durante una hora con solución de hibridación. Se hicieron dos lavados de 5 minutos y un último lavado de 10 minutos con PBS-Tween20. Tras este último lavado se escurrió bien la membrana y se le añadió 1 ml del reactivo ECL® por cada cm<sup>2</sup> de superficie (Amersham Biosciences). Se incubó durante 1 minuto. Se envolvió en film de plástico transparente y en oscuridad, se puso en contacto con una película de radiografía durante 10 minutos. La película se reveló en oscuridad usando soluciones de revelado para radiografía.

## **11. ESTUDIOS DE FERMENTACIÓN Y DE ESTABILIDAD PROTEICA.**

### **11.1 Fermentación de mostos sintéticos y naturales.**

Para la fermentación de mostos, se crecieron precultivos de levadura vínica en YPD y a partir de éstos se inocularon los mostos a una concentración de 10<sup>6</sup> células/ml. Las fermentaciones se llevaron a cabo a 20°C en matraces Erlenmeyer tapados con válvulas Müller que contenían ácido sulfúrico. El seguimiento de las fermentaciones se llevó a cabo midiendo la pérdida de peso de los matraces como consecuencia de la producción de CO<sub>2</sub>, hasta que éste permaneció constante. Llegado este momento los vinos se centrifugaron para eliminar las lías de levadura y se analizaron inmediatamente.

### **11.2 Determinación del poder fermentativo. Cuantificación de azúcares, etanol y glicerol en vino mediante HPLC.**

Los vinos fermentados fueron analizados mediante HPLC para determinar las concentraciones de los azúcares no consumidos durante la fermentación, así como el glicerol y etanol producidos. Para ello se utilizó un cromatógrafo Termo (Termo Electron Corporation, Whaltham, Massachussets, USA) equipado con una bomba cuaternaria P400 Spectra System, un inyector automático AS3000 y un detector de índice de refracción Spectra System RI150. La columna utilizada fue una HPX-87H (BIO-RAD) y como fase móvil se utilizó H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.5 mM. El flujo se fijó a 0,6 ml/min y la temperatura del horno a 50°C. Las muestras se filtraron a través de un filtro de PVDF de 0,45 µm de diámetro de poro (Teknokroma, España), se diluyeron de dos a diez veces y se inyectaron por duplicado. Las concentraciones de los compuestos analizados se determinaron intrapolando las áreas de los picos de los cromatogramas en una recta patrón elaborada con concentraciones diferentes de glucosa, fructosa, glicerol y etanol.

### **11.3 Medida de la estabilidad proteica de vinos Sauvignon blanc.**

Para la medida de la estabilidad proteica de los vinos se indujo la quiebra por calor y se comparó la turbidez de los vinos procedentes de diferentes muestras. Los ensayos se realizaron en alícuotas de 4,5 ml (9 réplicas por muestra) y se incubaron a 85°C durante 30 minutos en un bloque térmico Tembloc ® (Selecta, Barcelona, España). Se enfriaron rápidamente en hielo y una vez atemperadas se midió la turbidez de las mismas mediante un nefelómetro (Hach, Loveland, USA). Los datos se analizaron estadísticamente mediante ANOVA de una vía y test de Dunett para la comparación de las medias usando el programa informático SPSS 13.0. Se consideraron resultados significativamente diferentes para  $p < 0.05$ .

### **11.4 Determinación de la concentración mínima de bentonita necesaria para la estabilización proteica de vinos Sauvignon blanc.**

La concentración mínima de bentonita necesaria para la estabilización proteica de un vino, se determinó como aquella a partir de la cual un aumento en su

concentración no se ve traducido en una disminución de la turbidez del vino en el ensayo de estabilidad.

A 40 ml de vino se le añadieron concentraciones de 12, 24, 36, 48, y 60 g/hl de bentonita a partir de una solución stock en H<sub>2</sub>O destilada de 50 g/l. Las muestras se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en un agitador de balanceo y se centrifugaron a 5000 x g durante 5 minutos. Los sobrenadantes se decantaron y se filtraron a través de un filtro de 0,45 µm de diámetro de poro. La estabilidad proteica de las diferentes muestras se determinó tal y como se describe en el apartado anterior.

## **12. DETERMINACIÓN DE RESISTENCIA A LA TOXINA KILLER K9.**

Se inocularon las levaduras en tubos de YPD y se incubaron a 30°C y 140 rpm durante 24-48 horas. Se hicieron recuentos microscópicos de los cultivos y se realizaron las diluciones apropiadas para tener suspensiones celulares de  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$  y  $10^4$  células/ml.

De cada suspensión se aplicaron gotas de 5 µl en placas de YPD y de YPD+K9 y se dejaron secar. Las placas de YPD+K9 se incubaron durante 2 días a 30°C y se determinó la resistencia a la toxina killer 9 como disminución del crecimiento respecto a la réplica en YPD y crecida de la misma manera.

## **13. DETERMINACIÓN DE FENOTIPO AUTOLÍTICO.**

La liberación de fosfatasa alcalina citoplasmática está asociada con un fenotipo autolítico (Cabib *et al.* 1975, Molero *et al.* 1993). El BCIP es un sustrato de la fosfatasa alcalina, que al ser catalizado por ésta da lugar a un producto de color azul. Por todo ello, las colonias de levadura con un fenotipo autolítico presentarán una coloración azulada en presencia de BCIP.

Se crecieron cultivos en YPD y a partir de estos se inocularon placas de YPD+BCIP de la misma manera que lo realizado con las placas de YPD+K9. Las placas



se incubaron a 20°C durante 2-4 días y transcurrido ese tiempo, se comprobó el color de las colonias.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## **1. MEDIDA DE LA LIBERACIÓN DE POLISACÁRIDOS Y MANOPROTEÍNAS EN CEPAS DE LABORATORIO.**

El objetivo de la primera fase del estudio, fue el de determinar en cepas de laboratorio, genes cuya delección da lugar a una mayor liberación al medio de polisacáridos y manoproteínas. Para ello, diferentes cepas mutantes se cultivaron en medio GCY hasta alcanzar la fase estacionaria. Se aisló la fracción macromolecular presente en los sobrenadantes de los cultivos y se midió su concentración de polisacáridos mediante el método fenol/sulfúrico. Los datos obtenidos para cada cepa delecionada se compararon con el de la cepa control isogénica correspondiente. No todas las cepas presentaron una misma densidad óptica en la fase estacionaria, de modo que diferencias en la concentración de polisacáridos podrían ser debidas a diferencias en el crecimiento. Por ello, la comparación entre diferentes cepas se realizó tanto con los valores absolutos, como con los datos corregidos con la densidad óptica de los cultivos (resultado de dividir los valores medios de la concentración de polisacáridos, por la  $DO_{600}$  alcanzada en la fase estacionaria). De este modo, las diferencias en la concentración de polisacáridos podrían ser atribuidas al efecto de la delección del gen correspondiente, y no a diferencias en el crecimiento. Además, se detectaron las manoproteínas presentes en los sobrenadantes de los cultivos y se establecieron comparaciones entre las cepas delecionadas y sus controles.

El estudio se realizó en primer lugar en cepas haploides y, siempre que fue posible, en diferentes fondos genéticos. De este modo, se determinó si el fenotipo asociado a la delección de un gen en concreto era o no dependiente del fondo genético. Así, se identificaron varios genes cuya delección dio lugar a una mayor liberación de manoproteínas. Con el objetivo de determinar la dominancia o recesividad de este fenotipo, se realizó el estudio con cepas diploides, tanto homocigotas como heterocigotas para la delección.

### **1.1. Puesta a punto del ensayo de liberación de polisacáridos y manoproteínas en condiciones de laboratorio.**

En un principio, el medio de cultivo empleado para el crecimiento de las cepas fue YPD. Los polisacáridos presentes en el sobrenadante de los cultivos se aislaron por

precipitación con etanol, y se midió su concentración mediante el método fenol/sulfúrico. La concentración de polisacáridos determinada para el blanco (medio YPD sin inocular) fue muy alta, lo que impedía hacer interpretaciones fiables de los resultados obtenidos para los cultivos de las diferentes cepas. El método fenol/sulfúrico es un método de medida de azúcares totales, de modo que además de los polisacáridos liberados por las levaduras durante el crecimiento, también reaccionarán aquellos presentes en el medio de cultivo, así como otros azúcares (como por ejemplo los monosacáridos). Debido a esto, se decidió diseñar un medio de cultivo alternativo en el que las levaduras crecieran sin dificultad y que además no presentara valores muy altos en la medida de polisacáridos. Con el objetivo de identificar aquellos componentes del medio YPD (glucosa, peptona y extracto de levadura) que contribuyen en mayor medida a la elevada señal registrada en el medio sin inocular, se midió la concentración de polisacáridos de sus diferentes componentes por separado. De este modo, aquellos responsables de la elevada señal registrada, podrían ser substituidos por otros componentes que presentaran una señal menor. Tanto el extracto de levadura como la peptona presentaron valores muy elevados. Se decidió por tanto eliminarlos de la composición del medio. La peptona y los casaminoácidos son ambos derivados de la hidrólisis de la caseína, pero en el caso de los casaminoácidos, esta hidrólisis es mucho más completa de modo que sus componentes son de menor peso molecular. Esto permite que los casaminoácidos presentes en los sobrenadantes de los cultivos, puedan ser más fácilmente separados de la fracción macromolecular. Por ello, se decidió substituir la peptona por los casaminoácidos, a la misma concentración. Finalmente el medio diseñado se denominó GCY y su composición es la siguiente: glucosa 2% (p/v), casaminoácidos 2% (p/v) y Yeast Nitrogen Base 0,67% (p/v). El GCY no es un medio completo, de modo que fue necesario suplementarlo con uridina para complementar las auxotrofías de las cepas del estudio. La medida de la concentración de polisacáridos en el medio GCY dio valores muy bajos respecto a los registrados para el medio YPD. Sin embargo, al medir la concentración de polisacáridos de los componentes del medio YPD por separado, se observó que la glucosa al 2% presentaba señal, indicando que mediante la precipitación con etanol no solo precipitan los polisacáridos, sino también algunos monosacáridos y otras moléculas. Estos monosacáridos estarían falseando los resultados, de modo que se hizo necesario buscar un método alternativo de aislamiento de los polisacáridos, mediante el cual la señal registrada en los blancos fuera menor. Se optó entonces por substituir la precipitación con etanol por una cromatografía de

exclusión molecular, utilizando las columnas Econo-Pac 10DG®. Mediante este sistema las moléculas de bajo peso molecular se quedan retenidas durante más tiempo en la columna, mientras que las macromoléculas eluyen en el volumen muerto. Al pasar por la columna el medio GCY y estimar la concentración de polisacáridos del eluido, se obtuvo un valor suficientemente bajo. El método puesto a punto se describe en Materiales y Métodos, y es el que se utilizó para obtener los resultados que se describen a continuación.

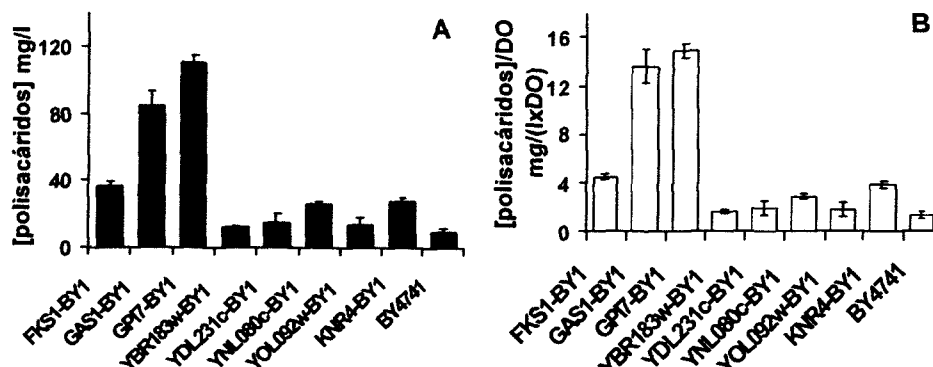
## **1.2. Liberación de polisacáridos y manoproteínas por cepas haploides de laboratorio.**

Se analizó por separado el efecto de la delección de 9 genes escogidos por su implicación en la síntesis de la pared celular, y para cuya delección se han descrito alteraciones en su composición o estructura. De entre estos genes se identificaron aquellos cuya delección dio lugar a una mayor liberación de manoproteínas al medio.

### *1.2.1. Cepas con fondo genético BY4741.*

Los resultados de la liberación de polisacáridos se muestran en la figura 15. El análisis estadístico realizado con los datos absolutos de concentración de polisacáridos, reveló diferencias significativas entre algunos mutantes y la cepa control (figura 15 A).

La concentración de polisacáridos liberados durante el crecimiento en GCY por parte de las cepas FKS1-BY1, GAS1-BY1, GPI7-BY1, YNL080c-BY1 y KNR4-BY1 fue significativamente superior a la liberada por la cepa control. De entre ellas cabe destacar las cepas GAS1-BY1 y GPI7-BY1 que liberaron ocho y once veces más polisacárido respectivamente que la cepa control. Además el resultado del test DMS (que compara cada media una a una con todas la demás) reveló que la concentración de polisacáridos media estimada para las cepas FKS1-BY1, GAS1-BY1 y GPI7-BY1 fue significativamente diferente entre sí, y también respecto al resto de cepas. Por lo tanto se puede afirmar que la cepa que más polisacárido liberó fue GPI7-BY1, seguida de GAS1-BY1, FKS1-BY1 y de KNR4-BY1.

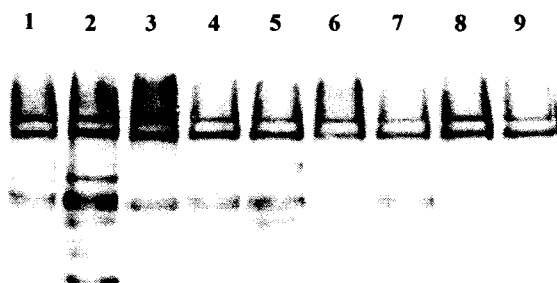


**Figura 15:** Polisacáridos liberados durante el crecimiento en GCY de las cepas con fondo genético de BY4741. Se representan los valores medios y la desviación estándar de los datos de concentración de polisacáridos. BY4741 es la cepa control. **A:** Valores absolutos. **B:** Valores corregidos con la  $DO_{600}$ .

La comparación entre los datos corregidos con la  $DO_{600}$  de los cultivos al alcanzar la fase estacionaria, mostró un resultado similar al obtenido con los datos absolutos (figura 15 B). Esto indica que las diferencias obtenidas entre los valores de concentración de polisacáridos de algunos mutantes y del control, no son debidas a un mayor crecimiento y sí a una mayor liberación por parte de éstos.

La detección con Concanavalina A marcada con Peroxidasa de las manoproteínas liberadas, confirmó en gran medida lo observado en la liberación de polisacáridos (figura 16). Aquellas cepas que liberaron una mayor concentración de polisacáridos, presentaron intensidades de banda superiores a las de la cepa control. Entre ellas destacan claramente sobre el resto las cepas GAS1-BY1 y GPI7-BY1, habiendo liberado además las mayores concentraciones de polisacáridos. La cepa FKS1-BY1 presenta también intensidades de banda superiores a las de la cepa control, aunque sin llegar a los niveles de las dos cepas anteriores. El resultado de FKS1-BY es coherente con los datos de concentración de polisacáridos, ya que a diferencia de GAS1-BY1 y GPI7-BY1, que liberaron 9 y 11 veces más respectivamente que la cepa control, liberó solamente 4 veces más cantidad. Las cepas YNL080c-BY1 y KNR4-BY1 liberaron casi 3 veces más polisacáridos que la cepa control, sin embargo a pesar de que la cepa KNR4-BY1 parece presentar una intensidad de banda superior, las diferencias no son concluyentes. Este resultado podría ser debido a que la mayor liberación de polisacáridos registrada, fuera exclusivamente resultado de la liberación de otros, como el  $\beta$ -glucano o la quitina. Otra opción que explicara este resultado, sería una diferencia

de sensibilidad entre el método fenol/sulfúrico y la detección de manoproteínas, es decir; que diferencias detectadas mediante el primer método (que es cuantitativo), no se detectarían mediante el segundo (que es semi-cuantitativo).



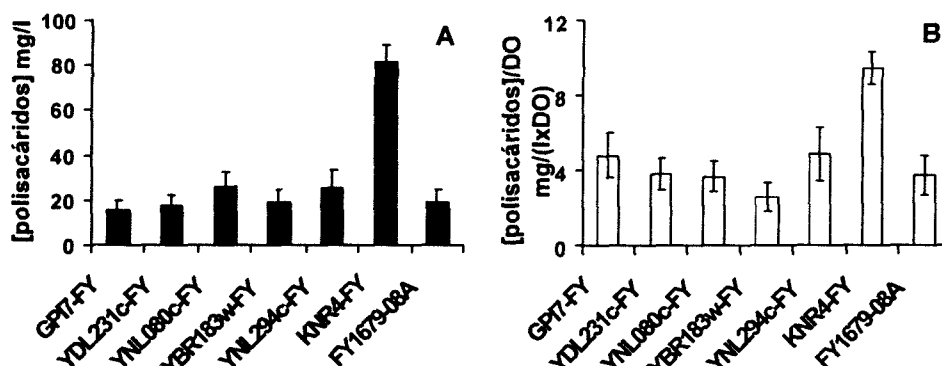
**Figura 16:** Manoproteínas liberadas en medio GCY por las cepas con fondo BY4741. 1: FKS1-BY1, 2: GAS1-BY1, 3: GPI7-BY1, 4: YBR183w-BY1, 5: YDL231c-BY1, 6: YNL080c-BY1, 7: YOL092w-BY1, 8: KNR4-BY1, 9: BY4741

Los resultados indican por tanto, que la delección de GAS1, GPI7 y FKS1, da lugar a una mayor liberación de polisacáridos, incluidas las manoproteínas, en fondo genético de BY4741.

#### 1.2.2. Cepas con fondo genético FY1679-08A.

En aquellos casos en los que fue posible, el efecto de la delección de los genes estudiados en fondo genético de BY4741, se estudió también en el fondo FY1679-08A. Estas cepas fueron cedidas por el Departamento de Microbiología II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

En la medida de la concentración de polisacáridos no se apreciaron diferencias entre la mayoría de los mutantes estudiados y la cepa control (figura 17 A). Solamente la concentración liberada por la cepa KNR4-FY, 2,5 veces superior a la de FY1679-08A, fue significativamente diferente. Tal y como muestran los datos relativos a la  $DO_{600}$ , ello fue debido a una mayor liberación y no a diferencias en el crecimiento (figura 17 B).

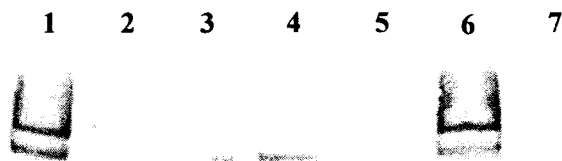


**Figura 17:** Polisacáridos liberados durante el crecimiento en GCY de las cepas con fondo genético FY1679-08A. Se representan los valores medios y la desviación estándar de los datos de concentración de polisacáridos. FY1679-08A es la cepa control. **A:** Valores absolutos. **B:** Valores corregidos con la  $DO_{600}$ .

Este resultado coincide con el observado en fondo BY4741, ya que aunque la diferencia no fue tan grande como en el fondo FY1679-08A, la cepa KNR4-BY1 también liberó una concentración significativamente superior al control. Lo observado para GPI7-FY sin embargo fue diferente. Mientras que en fondo genético BY4741 liberó la mayor concentración de polisacáridos, en fondo FY1679-08A no se apreciaron diferencias respecto a lo liberado por la cepa control (figura 17 A). GPI7-FY presentó un crecimiento claramente inferior al de FY1679-08A (datos no mostrados), sin embargo al corregir la concentración de polisacáridos con la  $DO_{600}$  tampoco se mostraron diferencias.

El resultado de la hibridación con Concanavalina A marcada con Peroxidasa para la cepa KNR4-FY, mostró un resultado coherente con lo observado en la cuantificación de polisacáridos. KNR4-FY liberó una mayor concentración de polisacáridos, incluidas las manoproteínas, dado que la intensidad de las bandas fue claramente superior a la de la cepa control (figura 18).





**Figura 18:** Manoproteínas liberadas en medio GCY por las cepas de con fondo FY1679-08A. 1: GPI7-FY, 2: YDL231c-FY, 3: YNL080c-FY, 4: YBR183w-FY, 5: YNL294c-FY, 6: KNR4-FY, 7: FY1469-08A.

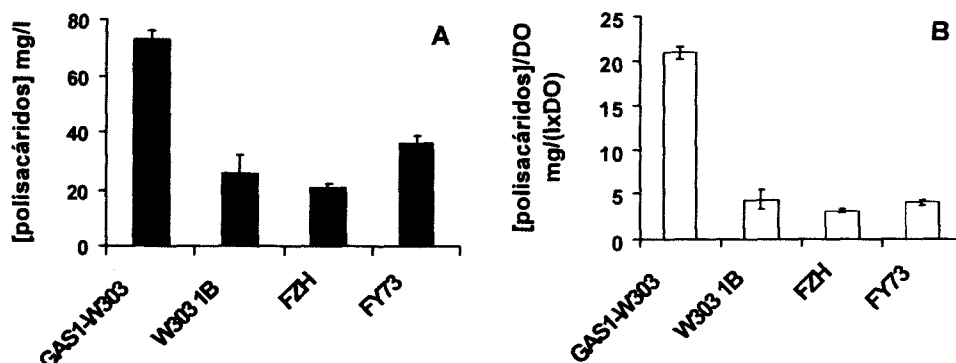
La cepa GPI7-FY, que no liberó más polisacáridos que la cepa control, sin embargo presentó una intensidad de banda mayor (figura 18). Esto indicaría que a pesar de no liberar más polisacáridos, la proporción en manoproteínas se ve aumentada.

### 1.2.3. Otros fondos genéticos.

Las cepas con fondo genético W303-1B fueron proporcionadas por Laura Popolo de la Università degli studi di Milano, y las de fondo genético FY73 por Eulogio Valentín de la Universidad de Valencia.

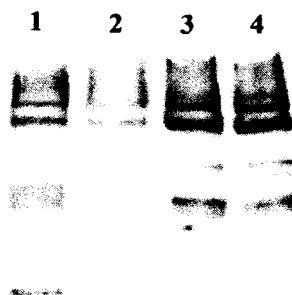
De igual manera que lo observado en fondo BY4731, la cepa deletada en *GAS1* en fondo genético W303 1B liberó una cantidad de polisacáridos significativamente superior a la de la cepa control (figura 19 A). Esta diferencia sin embargo no fue tan acusada, ya que en fondo W303 1B liberó 3 veces más, frente a las 6 veces más liberadas en fondo BY4741. Por otro lado, la cepa *GAS1*-W303 alcanzó una  $DO_{600}$  en la fase estacionaria inferior a la de W303 1B (no se muestran los datos), de modo que con los datos relativos, las diferencias son aun mayores.

La cepa FZH (deletada en YPL133C en fondo genético de FY73) no solo no liberó más cantidad de polisacáridos que la cepa isogénica control, sino que la cantidad liberada fue significativamente inferior (figura 19).



**Figura 19:** Polisacáridos liberados durante el crecimiento en GCY de las cepas con fondo genético de W303-1B y FY73. Se representan los valores medios y la desviación estándar de los datos de concentración de polisacáridos. W303 1B y FY73 son las cepas control de GAS1-W303 y de FZH respectivamente. **A:** Valores absolutos. **B:** Valores corregidos con la DO<sub>600</sub>.

La detección de las manoproteínas reveló una mayor liberación para GAS1-W303 (figura 20), habiendo liberado además una mayor concentración de polisacáridos. Las diferencias registradas en la concentración de polisacáridos por parte de las cepas FZH y FY73 por el contrario, no se observaron en la detección de manoproteínas (figura 20).



**Figura 20:** Manoproteínas liberadas en medio GCY por las cepas de con fondo W303 1B y FY73. 1: GAS1-W303, 2: W303-1B, 3:FZH, 4:FY73.

### 1.3. Liberación de polisacáridos y manoproteínas por cepas diploides de laboratorio.

El estudio del efecto de la delección en cepas diploides, de los genes que han dado un buen resultado en cepas haploides, es interesante por varias razones. El objetivo del estudio es el de construir cepas vínicas que superproduzcan manoproteínas, mediante la delección de genes. Las cepas vínicas son diploides o poliploides pero nunca haploides, de modo que es importante conocer la dominancia o recesividad del fenotipo asociado a las delecciones. Por otro lado, los genes estudiados están implicados en el mantenimiento de la integridad de la pared celular, de modo que su delección puede afectar negativamente a la supervivencia o capacidad de crecimiento de las células. Por ello, tal y como se ha observado para la delección en otros genes (Tabera *et al.* 2006), la delección en heterozigosis podría suponer una expresión del fenotipo de interés pero con un menor impacto sobre la viabilidad celular.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con las cepas de laboratorio, los genes seleccionados para el estudio en cepas diploides fueron los siguientes:

La delección de *GAS1* dio lugar a un fenotipo similar en los dos fondos genéticos en los que se estudió. En ambos casos tanto la concentración de polisacáridos como la de manoproteínas fue claramente superior a la de los controles.

La delección de *KNR4* en fondo BY4741 dio lugar a una mayor concentración de polisacáridos, pero la detección de las manoproteínas no permite establecer diferencias con el control. En fondo FY1679-08A sin embargo, no solamente hay claras diferencias en la concentración de manoproteínas, sino que las diferencias en la concentración de polisacáridos son mayores que en el caso del fondo BY4741.

La delección de *GPI7* presenta un comportamiento diferente en los dos fondos genéticos estudiados. Mientras que en BY4741 es la cepa que más manoproteínas y polisacáridos libera respecto al control, en FY1679-08A esas diferencias no se aprecian de igual manera. Sí se observa sin embargo, una mayor proporción de manoproteínas en la fracción de polisacáridos liberada.

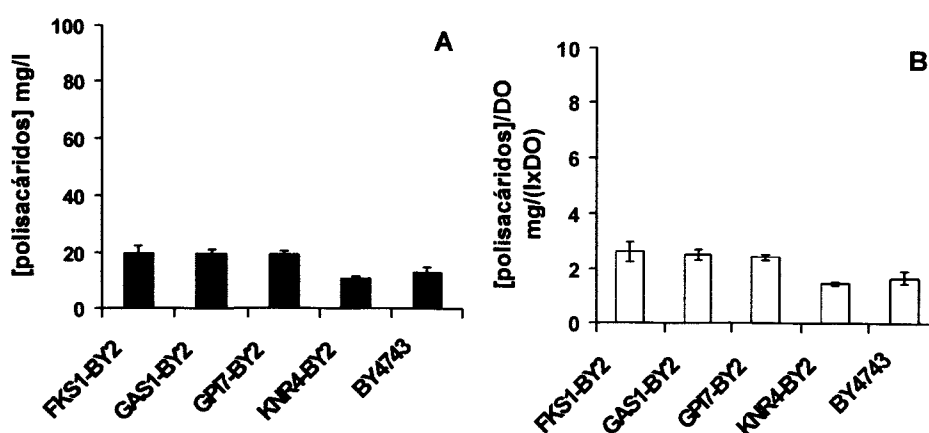
Los datos indican un efecto del fondo genético sobre la expresión del fenotipo, para la delección de los genes *GAS1*, *KNR4* y *GPI7*, dado que las diferencias en las concentraciones de polisacáridos liberados, son más o menos acusadas en función de éste.

En el caso del gen *FKS1* solamente se disponía de la cepa delecionada en fondo BY4741 de modo que no se pudo estudiar el efecto del fondo genético sobre el fenotipo asociado a su delección. En este fondo genético, *FKS1*-BY1 liberó una mayor cantidad de polisacáridos y manoproteínas por lo que se seleccionó para su estudio en cepas diploides.

Todas las cepas diploides utilizadas tienen fondo genético de BY4743 y proceden de la colección Euroscarf. Para el estudio de la liberación de manoproteínas en estas cepas, el procedimiento seguido fue el mismo que para las cepas haploides.

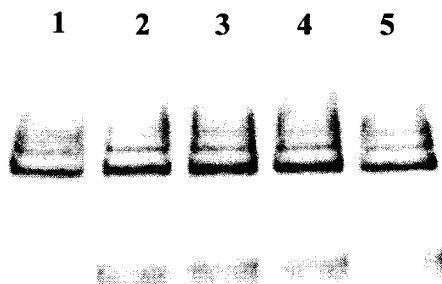
### 1.3.1. Cepas heterozigotas.

A diferencia de lo observado en las cepas haploides, ninguna de las cepas diploides delecionadas en una única copia de los genes, liberó más polisacáridos que la cepa control (figura 21).



**Figura 21:** Polisacáridos liberados durante el crecimiento en GCY de las cepas diploides delecionadas en una sola copia de los genes *FKS1*, *GAS1*, *GPI7* y *KNR4* respectivamente. Se representan los valores medios y la desviación estándar de los datos de concentración de polisacáridos. BY4743 es la cepa control. A: Valores absolutos. B: Valores corregidos con la  $DO_{600}$ .

La detección de las manoproteínas con Concanavalina A marcada con Peroxidasa mostró un resultado similar al observado para la cuantificación de polisacáridos mediante el método del fenol/sulfúrico (figura 22), todas las cepas delecionadas liberan una cantidad de manoproteínas similar a la liberada por la cepa control.

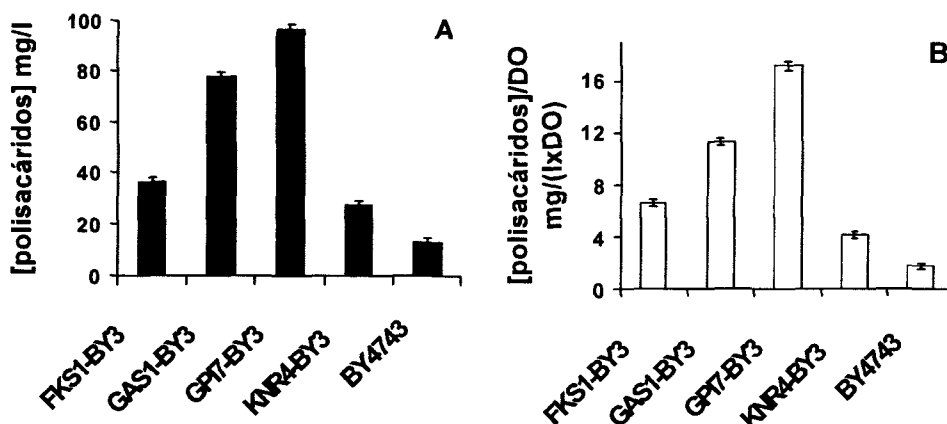


**Figura 22:** Manoproteínas liberadas en medio GCY por las cepas diploides heterozigotas. 1: FKS1-BY2, 2: GAS1-BY2, 3: GPI7-BY2, 4: KNR4-BY2, 5: BY4743.

Es importante destacar, que a diferencia de las cepas haploides delecionadas en los cuatro genes, que presentaron un crecimiento más lento que las respectivas cepas control, las cepas heterozigotas no mostraron alteración alguna en su velocidad de crecimiento (datos no mostrados).

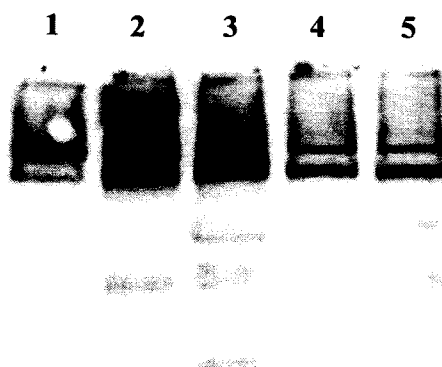
### 1.3.2. Cepas homozigotas.

El resultado obtenido para las cepas diploides delecionadas en todas las copias de *FKS1*, *GAS1*, *GPI7* y *KNR4* respectivamente, fue muy similar al observado en las cepas con fondo genético de BY4741 (figura 23). La cepa que más polisacáridos liberó fue GPI7-BY3, seguida de GAS1-BY3, que liberaron 7,5 y 6 veces más que BY4743 respectivamente. FKS1-BY3 liberó casi 3 veces más que la cepa control y KNR4-BY3 algo más del doble.



**Figura 23:** Polisacáridos liberados durante el crecimiento en GCY de las cepas diploides delecionadas en todas las copias de los genes *FKS1*, *GAS1*, *GPI7* y *KNR4* respectivamente. Se representan los valores medios y la desviación estándar de los datos de concentración de polisacáridos. BY4743 es la cepa control. A: Valores absolutos. B: Valores corregidos con la DO<sub>600</sub>.

La señal obtenida en la detección de manoproteínas también fue muy similar a la observada para las cepas con fondo BY4741. No fue posible establecer diferencias entre BY4743 y la cepa delecionada en *KNR4*, pero sí con el resto de cepas. En el caso de la cepa delecionada en *FKS1*, se aprecia una concentración de las manoproteínas de gran tamaño ligeramente mayor, mientras que en las cepas delecionadas en *GPI7* y *GAS1* la concentración de manoproteínas es claramente superior (figura 24).

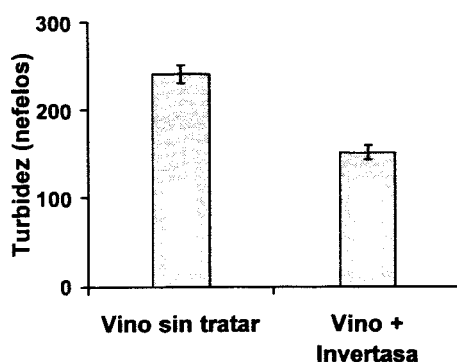


**Figura 24:** Manoproteínas liberadas en medio GCY por las cepas diploides homocigotas. 1: FKS1-BY3, 2: GAS1-BY3, 3: GPI7-BY3 4: KNR4-BY3. 5: BY4743.

Estos resultados confirman un fenotipo recesivo, ya que es necesaria la deleción de todas las copias de los cuatro genes para que se exprese.

#### 1.4. Estudio de la estabilización proteica de las manoproteínas y polisacáridos liberados por cepas de laboratorio.

Como se ha mencionado anteriormente, una de las propiedades de las manoproteínas es la de disminuir la susceptibilidad de determinados vinos blancos de sufrir quiebra proteica. Por ello, se determinó si las diferencias en la concentración de manoproteínas liberadas por las cepas mutantes y la control, se traducen en diferencias en la estabilización proteica de un vino. El estudio se realizó con las manoproteínas liberadas por las cepas haploides y el sustrato utilizado fue un mosto de uva de la variedad *Sauvignon Blanc*, fermentado por la cepa T73. La quiebra proteica se indujo por calor, y como control positivo de la estabilización, se utilizó invertasa de levadura a una concentración de 0,25 g/l. Ambos vinos vieron notablemente aumentada su turbidez tras el tratamiento con calor, y además la turbidez presentada por el vino al que se le añadió invertasa fue un 40% inferior que la del vino control (figura 25). Este resultado indicó que el vino fermentado era susceptible de sufrir quiebra proteica y que además era estabilizable por invertasa, haciéndolo un buen sustrato para la medida de la estabilización proteica de los polisacáridos liberados por las cepas de laboratorio.

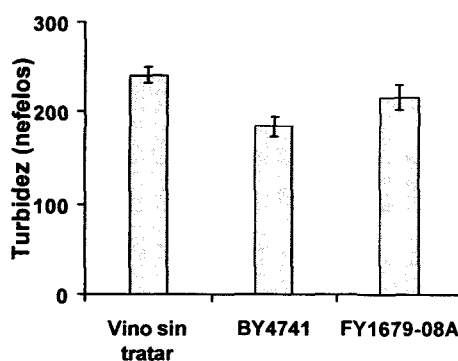


**Figura 25:** Turbidez de dos vinos en los que se ha inducido la quiebra proteica por calor, uno sin tratar, y el otro tratado con 0,25 g/l de invertasa

Para este estudio se inocularon con cada una de las cepas, 50 ml de GCY a una  $DO_{600}$  de 0,1 y se incubaron a 30°C y 140 rpm hasta alcanzar la fase estacionaria. Los cultivos se centrifugaron para eliminar las células y los sobrenadantes se pasaron a través de columnas Econo-Pac 10DG® para eliminar las moléculas de bajo peso

molecular. La fracción eluida se liofilizó y fue añadida a 50 ml de vino *Sauvignon Blanc* sobre el que se indujo la quiebra proteica.

El objetivo de este ensayo fue el de determinar si el material liberado durante el crecimiento en GCY por las diferentes cepas delecionadas, estabiliza el vino de una manera diferente a cómo lo hace la cepa control. Por lo tanto, previamente se hizo necesario determinar si el material liberado por las dos cepas control era capaz de estabilizar el vino. En la figura 26 observamos como el material liberado por ambas cepas es capaz de disminuir la turbidez de un vino en el que se ha inducido la quiebra proteica.



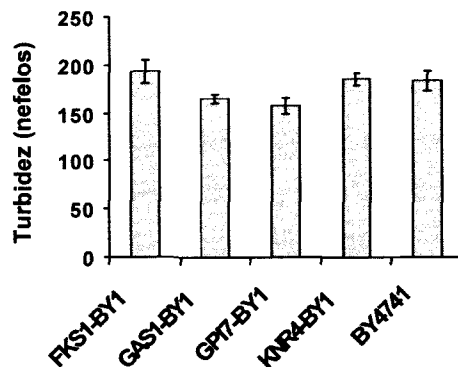
**Figura 26:** Turbidez de vinos en los que se ha inducido la quiebra proteica, tratados con el material liberado durante el crecimiento en GCY por las cepas control

BY4741 estabilizó el vino casi en un 25% y FY1679-08A lo hizo en un 10%. De este modo, a la hora de estudiar la capacidad de estabilización del material liberado por las cepas delecionadas, se hizo tomando como referencia la turbidez de sus respectivas cepas control.

En la figura 27 se muestra la turbidez obtenida por los vinos tratados con el material liberado por las cepas delecionadas en fondo genético BY4741. Se observa como la turbidez obtenida para las cepas FKS1-BY1 y KNR4-BY1 fue similar a la obtenida para la cepa control. El análisis estadístico sin embargo, reflejó valores de turbidez significativamente diferentes del control para las cepas GAS1-BY1 y GPI7-

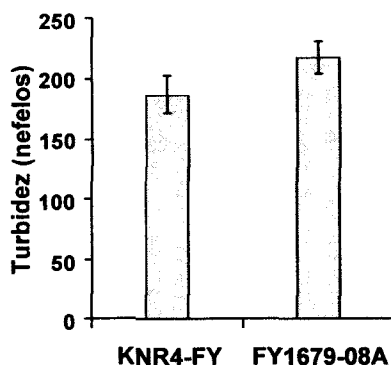


BY1. El material liberado por la cepa GAS1-BY1 estabilizó el vino un 10% más que BY4741 y GPI7-BY1 lo hizo en un 15% más.



**Figura 27:** Turbidez de los vinos en los que se ha inducido la quiebra proteica, tratados con el material liberado durante el crecimiento en GCY por parte de las cepas con fondo BY4741 seleccionadas en la primera fase del estudio.

En el caso de la delección de *KNR4* el estudio se realizó, además de en fondo genético BY4741, en FY1679-08A. El interés fue debido a que en ese fondo genético, la diferencia entre la cantidad liberada por la cepa delecionada y la control, fue mucho mayor que en BY4741. El análisis de la estabilización proteica, mostró que el material liberado por la cepa KNR4-FY redujo la turbidez del vino en un 15% respecto a FY1679-08A (figura 28).



**Figura 28:** Turbidez de los vinos en los que se ha inducido la quiebra proteica, tratados con el material liberado durante el crecimiento en GCY por parte de las cepas que se indican.

### 1.5. Discusión de los datos obtenidos con cepas de laboratorio.

El estudio realizado con cepas de laboratorio, permitió la identificación de cuatro genes, *KNR4*, *GPI7*, *FKS1* y *GAS1*, cuya delección da lugar a una mayor liberación de manoproteínas. Además, en algunos casos, el aumento en la liberación de manoproteínas se tradujo en la mayor estabilidad proteica de un vino. Estos genes por lo tanto, son interesantes para ser deleccionados en cepas vínicas y conseguir una mayor liberación de manoproteínas durante la fermentación de un vino. No obstante, es importante considerar varias cuestiones respecto a su aplicación en cepas vínicas.

La delección de *GAS1* dio lugar a una mayor liberación de manoproteínas en los dos fondos genéticos estudiados. Además, al añadir el material liberado por la cepa *GAS1*-BY1 a un vino al que se le indujo la quiebra proteica, se obtuvo una mayor estabilización que la cepa control. Debido a esto, se propuso como un candidato interesante para ser deleccionado en cepas vínicas, y obtener cepas que liberen más manoproteínas y estabilicen el vino frente a quiebra proteica. No obstante, las cepas deleccionadas en *GAS1* presentaron un crecimiento reducido,

El resultado obtenido para las cepas deleccionadas en *GPI7* fue algo diferente. La cepa deleccionada en fondo BY4741 liberó una cantidad de manoproteínas sensiblemente mayor que la cepa control y además este material estabilizó mejor un vino frente a quiebra proteica. Sin embargo, en fondo FY1679-08A el fenotipo no se expresó de la misma manera, lo que podría indicar un efecto significativo del fondo genético sobre la liberación de manoproteínas en cepas deleccionadas en *GPI7*. Por ello, aunque *GPI7* pueda ser un buen candidato para ser deleccionado en cepas vínicas, es importante tener en cuenta el fondo genético en el que se realice, ya que puede ser determinante en la expresión del fenotipo.

La delección de *KNR4* dio lugar en los dos fondos genéticos estudiados, a una mayor liberación de manoproteínas, más acusada en fondo FY1679-08A que en BY4741. El material liberado por *KNR4*-BY1 sin embargo no estabilizó el vino en mayor medida que BY4741 mientras que *KNR4*-FY sí que lo hizo respecto a FY1679-08A. Al igual que lo observado para *GPI7*, podría haber un efecto importante del fondo genético sobre la liberación de manoproteínas en las cepas deleccionadas en *KNR4*. Esto

debe ser tenido en cuenta a la hora de analizar los resultados que se obtengan mediante la delección del gen en una cepa vínica.

El efecto de la delección de *FKS1* solamente se pudo estudiar en fondo BY4741, de modo que no fue posible determinar si el fondo genético influye de la misma manera en la que lo hace sobre las delecciones de *GPI7* y *KNR4*. *FKS1*-BY liberó más manoproteínas que BY4741, sin embargo el material liberado no estabilizó el vino en mayor medida que la cepa control. Siendo esto así, *FKS1* no sería un buen candidato para ser deleccionado en cepas vínicas que liberen más manoproteínas, y estabilicen el vino frente a quiebra proteica. Sin embargo hay que tener en cuenta que el estudio consistió en añadirle manoproteínas liberadas por cepas de laboratorio, a un vino que ya contenía manoproteínas procedentes de la cepa con la que se fermentó. De este modo, a causa de la considerable cantidad de manoproteínas que contiene el vino, pequeñas diferencias en la concentración de las manoproteínas añadidas podrían no ser suficientes para traducirse en diferencias en su estabilidad proteica. No obstante, si estas diferencias se manifestaran en las levaduras utilizadas en la fermentación, podrían traducirse en una estabilidad proteica mayor de los vinos fermentados. Por esta razón, *FKS1* también se seleccionó para ser deleccionado en cepas vínicas.

La delección de los cuatro genes seleccionados, da lugar a una composición y/o estructura alterada de la pared celular, y dado que esta actúa como barrera de protección de las células, puede que su viabilidad esté afectada. De hecho, cepas deleccionadas en algunos de los genes se han mostrado más sensibles a agentes desestabilizadores de la pared celular como el calcofluor white, la cafeína, o el rojo Congo. Además, las cepas deleccionadas en todas las copias, mostraron un crecimiento más lento que las cepas control y la densidad óptica de sus cultivos al alcanzar la fase estacionaria fue también inferior. Estos datos son importantes teniendo en cuenta que el objetivo de la tesis es el de construir cepas vínicas deleccionadas en estos genes, que liberen más manoproteínas y que sean capaces de fermentar un vino. Las condiciones de vinificación son más estresantes para las células que los cultivos realizados en el laboratorio. La disponibilidad de nutrientes en el mosto, especialmente la fuente de nitrógeno, puede ser limitante para las células, con el correspondiente efecto negativo que esto puede tener sobre el crecimiento. Además, factores como el pH del mosto, la alta presión osmótica debida a su elevada concentración de azúcares y la cantidad de etanol

producido en la fermentación, pueden suponer unas condiciones demasiado severas para la viabilidad en cepas que presentan una pared celular alterada.

Por lo tanto, en los análisis a realizar con las cepas vínicas que se construyan, se pondrá una especial atención no solo en la liberación de manoproteínas, sino también en su capacidad de fermentar un mosto natural.

## **2. CONSTRUCCIÓN DE CEPAS VÍNICAS DE LEVADURA DELECCIONADAS EN LOS GENES *KNR4*, *GPI7*, *FKS1* Y *GAS1*.**

Los estudios realizados con cepas de laboratorio demostraron que el fenotipo de mayor liberación de manoproteínas asociado a la delección de *KNR4*, *GPI7*, *FKS1* y *GAS1*, es recesivo. Teniendo esto en cuenta, la construcción de cepas vínicas de *S. cerevisiae* superproductoras de manoproteínas, implicó la delección de todas las copias de los cuatro genes. Además, en algunos casos la expresión del fenotipo puede estar condicionada por el fondo genético, de modo que las delecciones se realizaron sobre dos fondos genéticos diferentes, aumentando así la probabilidad de obtener el fenotipo de interés. Las cepas vínicas empleadas fueron Lalvin EC1118® (comercializada por Lallemant) y T73-4 (auxótrofa para uridina).

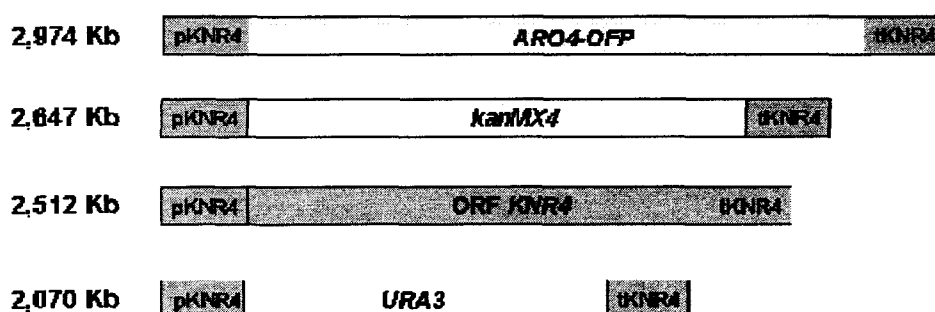
Se diseñó un sistema de delección por recombinación homóloga en el que la ORF del *locus* original fuera reemplazada por un gen marcador, y en la delección de cada copia se empleó un marcador de selección diferente. Para ello se construyeron cassettes de delección, consistentes en el gen marcador flanqueado por regiones de 500 pares de bases, correspondientes a la región promotora y terminadora del gen diana respectivamente.

Los diferentes elementos de los cassettes de delección se clonaron en un plásmido. Usando estos plásmidos como molde, o bien el gDNA de cepas ya delecionadas en algunos genes, los cassettes de delección se amplificaron por PCR. En la tabla 3 se resumen los detalles más relevantes de los cassettes de delección utilizados en este estudio. Las cepas fueron transformadas con los cassettes de delección y el análisis de los transformantes se realizó por PCR mediante dos sistemas diferentes, PCR

a tiempo real y PCR convencional. Los cebadores utilizados en la PCR a tiempo real hibridan en el gen marcador, y en una región adyacente al punto de inserción respectivamente (Figura 14). De este modo la amplificación solamente es posible en el caso de que la ORF del gen esté reemplazada por el gen marcador. El criterio de aceptación fue la presencia de amplificación. El otro sistema empleado consistió en la amplificación del *locus* completo del gen a deletar, con cebadores que hibridan upstream y downstream respectivamente al punto de inserción. De este modo se obtendrían fragmentos de diferente tamaño para el *locus* original, y para la ORF reemplazada por los diferentes genes marcadores. En este caso, el criterio de aceptación fue la obtención de amplicones del tamaño esperado.

## 2.1. Construcción de cepas delecionadas en *KNR4*.

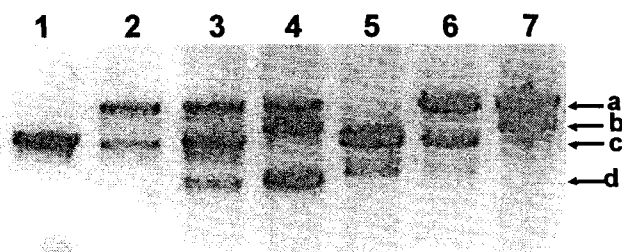
EC1118 fue transformada con el cassette DKNR4-1, y de esta transformación se obtuvieron 15 transformantes que se analizaron mediante PCR a tiempo real. Los cebadores empleados para ello fueron PromARO4Q y TermKNR4Q (tabla 2). Siete de los transformantes presentaron una amplificación positiva, resultado que se confirmó por la amplificación del *locus KNR4* con los cebadores CDKNR-f y CDKNR-r. En la figura 29 se muestran los diferentes tamaños de amplicón posibles como resultado de esta PCR.



**Figura 29:** Tamaño de los fragmentos esperados en la amplificación mediante PCR del *locus KNR4*, en función del gen marcador que reemplace la ORF. pKNR4 y tKNR4 indican el promotor y terminador de *KNR4* respectivamente.

Para los siete transformantes se obtuvieron dos bandas, una correspondiente al *locus* original y otra correspondiente al alelo delecionado con *ARO4-ORF* (Figura 30, calle 6). Uno de los transformantes se denominó EKD/2-1 y se seleccionó para su

posterior transformación con el cassette de delección DKNR4-3 (que contiene el marcador *kanMX4*). De esta transformación se obtuvieron once transformantes. Al amplificar por PCR el *locus KNR4* ninguno de ellos presentó la banda correspondiente al alelo original y sí dos bandas correspondientes a las copias delecionadas con *ARO4-OFD* y *kanMX4* (figura 30, calle 7). Uno de los transformantes fue seleccionado y se denominó EKD-13.



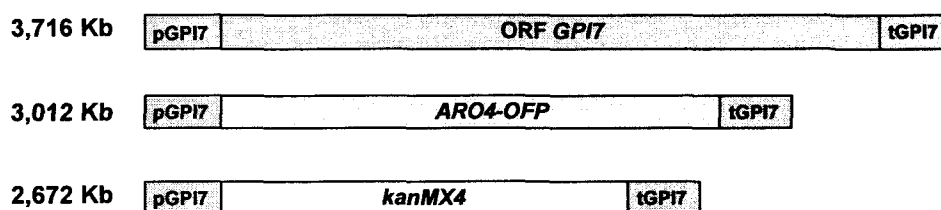
**Figura 30:** Amplificación por PCR del *locus KNR4* a partir de gDNA de diferentes cepas. 1: T74-3, 2: TKD/2-1, 3: TKD-12, 4: TKD-123, 5: EC1118, 6: EKD/2-1, 7: EKD-13. a: *KNR4* delecionado con *ARO4-OFD*, b: *KNR4* delecionado con *kanMX4*, c: *locus* original de *KNR4*, d: *KNR4* delecionado con *URA3*.

De la transformación de T73-4 con DKNR4-1 se obtuvieron 15 transformantes, y tres de ellos presentaron amplificación en la PCR a tiempo real. En la confirmación por amplificación del *locus KNR4*, los tres presentaron un patrón de bandas idéntico a EKD/2-1, indicando que una de las copias del alelo original de *KNR4* había sido reemplazada por *ARO4-OFD* (figura 30, calle 2). Uno de los transformantes, que se denominó TKD/2-1 fue seleccionado y se transformó con el cassette de delección DKNR4-2, que contiene el marcador *URA3*. Se analizaron 40 transformantes por PCR a tiempo real y cuatro de ellos presentaron una amplificación positiva. La confirmación por amplificación del *locus KNR4* mostró un resultado inesperado. Se obtuvieron tres bandas, una correspondiente a la copia delecionada con *ARO4-OFD*, otra correspondiente a la copia delecionada con *URA3*, y una última copia correspondiente al *locus* original, indicando que la cepa T73-4 tiene al menos tres copias del gen *KNR4* (figura 30, calle 3). Se seleccionó uno de los transformantes que se denominó TKD-12 y se transformó con el cassette de delección DKNR4-3 (que contiene el marcador *kanMX4*). Se obtuvieron doce transformantes, dos de ellos eran idénticos a TKD-12, en cuatro de ellos se había producido el reemplazamiento del marcador *ARO4-OFD* por *kanMX4*, en otros cuatro *kanMX4* había substituido el marcador *URA3* y finalmente, dos

de las cepas presentaron todas las copias del alelo original delecionadas (Figura 30, calle 5). Se seleccionó uno de estos transformantes y se denominó TKD-123.

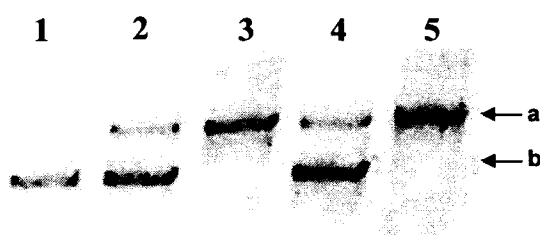
## 2.2. Construcción de cepas delecionadas en *GPI7*.

De la transformación de T73-4 con el cassette de delección DGPI7-1, se obtuvieron 24 transformantes que se analizaron mediante PCR a tiempo real usando los cebadores PromARO4Q y TermGPI7Q. El análisis mostró una amplificación clara para tres de los transformantes y se obtuvo una amplificación dudosa en el caso de otro. Para confirmar la correcta inserción del cassette se amplificó el *locus GPI7* con los cebadores CDGPI7-f y CDGPI7-r, siendo el tamaño de los amplicones diferente en función de si se trata del *locus* original, el delecionado con *ARO4-ORF* o con *kanMX4* (figura 31).



**Figura 31:** Tamaño de los fragmentos esperados en la amplificación mediante PCR convencional del *locus GPI7*, en función de si la ORF está reemplazada por los diferentes genes marcadores. pGPI7 y tGPI7 indican el promotor y terminador de *GPI7* respectivamente.

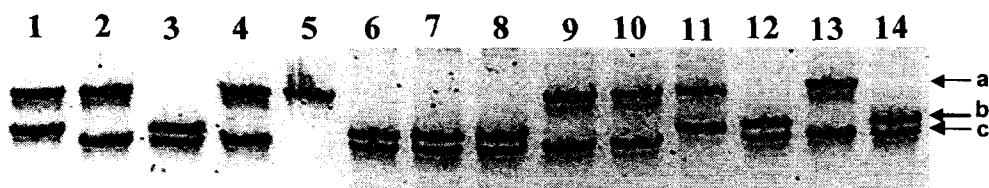
El resultado de la amplificación se muestra en la figura 32:



**Figura 32:** Amplificación por PCR del *locus GPI7* a partir de gDNA de diferentes cepas, realizada tras la transformación de T73-4 con DGPI7-1. 1-4: transformantes 14, 5: T73-4. a: *locus* original de *GPI7*. b: *locus* delecionado con *ARO4-ORF*.

Se seleccionó el transformante 1, que presentó dos bandas, una correspondiente al *locus* original y otra al *locus* delecionado con *ARO4-ORF*, y se le denominó TGD/2-1. Esta cepa se transformó con el cassette de delección DGPI7-3 (que contiene el

marcador *kanMX4*) y se obtuvieron 21 transformantes. El *locus GPI7* se amplificó usando los cebadores CDGPI7-f y CDGPI7-r. El resultado obtenido para el análisis de 12 de los transformantes se muestra en la figura 33:

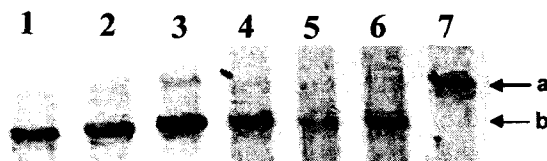


**Figura 33:** Amplificación por PCR del *locus GPI7* a partir de gDNA de diferentes cepas, tras la transformación de TGD/2-1 con DGPI7-3. 1-4: transformantes 1-4, 5: T73-4, 6-10: transformantes 5-9, 11: TGD/2-1, 12-14: transformantes 10-12. a: *locus* original, b: *locus* deletado con *ARO4-OF*P, c: *locus* deletado con *kanMX4*.

De los 20 transformantes, solamente uno de ellos presentó un patrón de bandas igual al de TGD/2-1 (figura 33, calles 1 y 11), indicando que podría tratarse de un falso transformante o que el marcador *kanMX4* podría haberse integrado en otro lugar del genoma. Respecto al resto de transformantes, todos presentaron una banda correspondiente al *locus KNR4* deletado con *kanMX4*, indicando su correcta inserción. De ellos, 9 presentaron la banda correspondiente al *locus* original mientras que la correspondiente al *locus* deletado con *ARO4-OF*P no estaba presente, indicando que esta última había sido reemplazada por *kanMX4*. Ninguno de los otros 10 transformantes presentó la banda correspondiente al *locus* original y sí dos bandas, una correspondiente al alelo deletado con *ARO4-OF*P y otra con *kanMX4*. Se seleccionó el transformante 3 y se denominó TGD-13.

La delección de *GPI7* en EC1118 se realizó de igual manera que en T73-4. De una primera transformación con DGPI7-1 se obtuvieron 18 transformantes, 6 de los cuales fueron positivos en el análisis por PCR a tiempo real. La amplificación del *locus GPI7* dio para todos ellos una banda correspondiente al alelo deletado con *ARO4-OF*P (figura 34).

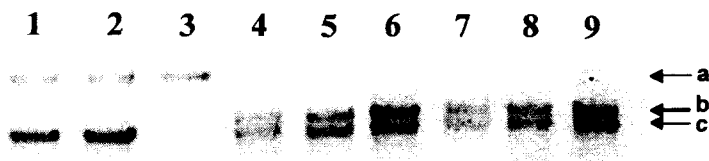




**Figura 34:** Amplificación por PCR del *locus GPI7* a partir de gDNA de diferentes cepas, realizada tras la transformación de EC1118 con DGPI7-1. 1-6: transformantes 1-6. 7: EC1118. a: *locus* original de *GPI7*, b: *GPI7* deletado con *ARO4-OFD*.

La banda correspondiente al alelo original, que se observa en la amplificación donde se usó gDNA de EC1118 como molde, no se detectó en algunos de los transformantes y en otros fue muy tenue, indicando como posible causa una baja eficiencia de la PCR. Se seleccionó el transformante 3 y se denominó EGD/2-1.

De la transformación de EGD/2-1 con el cassette de delección DGPI7-3 se obtuvieron 22 transformantes, y en la figura 35 se muestra el análisis realizado a 8 de ellos.



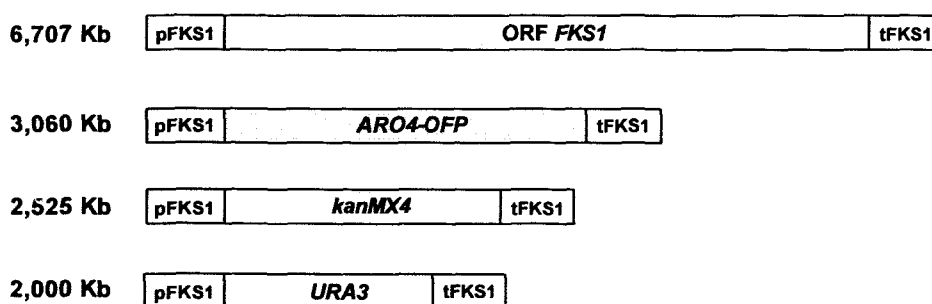
**Figura 35:** Amplificación por PCR del *locus GPI7* a partir de gDNA de diferentes cepas, realizada tras la transformación de EGD/2-1 con DGPI7-3. 1-2: transformantes 1-2, 3: EC111, 4-9: transformantes 3-8. a: *locus* original de *GPI7*, b: *GPI7* deletado con *ARO4-OFD*, c: *GPI7* deletado con *kanMX4*.

Dos transformantes presentaron una banda correspondiente al *locus* original y otra correspondiente a la copia deletada con *kanMX4*. Seis de los mutantes no presentaron ninguna banda correspondiente al *locus* original y sí dos bandas correspondientes a las copias deletadas con *ARO4-OFD* y *kanMX4* respectivamente. Se seleccionó el transformante 6 y se denominó EGD-13.

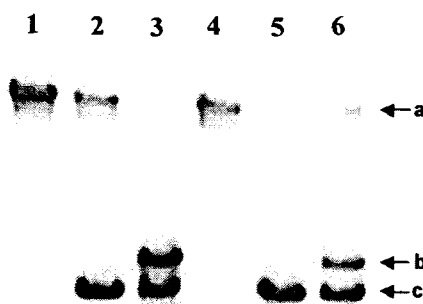
### 2.3. Construcción de cepas deletadas en *FKS1*.

El cassette de delección DFKS1-3 (que contiene el marcador *kanMX4*) se amplificó usando gDNA de la cepa FKS1-BY1 como molde, y fue utilizado para transformar EC1118. De la transformación se obtuvieron 3 transformantes que se

analizaron por PCR convencional, usando los cebadores CDFKS-f y CDFKS-r. En la figura 36 se muestran los tamaños de amplicón posibles. El resultado de la amplificación mostró para los tres transformantes una banda de correspondiente al *locus* original y otra correspondiente al deleciónado con *kanMX4* (figura 37, calle 2). Se seleccionó uno de ellos que se denominó EFD/2-3 y se transformó con el cassette de deleción DFKS1-1. Se analizaron 22 transformantes de los cuales 2 presentaron una sola copia deleciónada con *ARO4-OFP* y otro de ellos presentaba dos copias deleciónadas con *ARO4-OFP* y *kanMX4* respectivamente (figura 37, calle 3). Se seleccionó este transformante y se denominó EFD-31.



**Figura 36:** Tamaño de los fragmentos esperados en la amplificación mediante PCR del *locus FKS1*, en función de si la ORF está reemplazada por los diferentes genes marcadores.



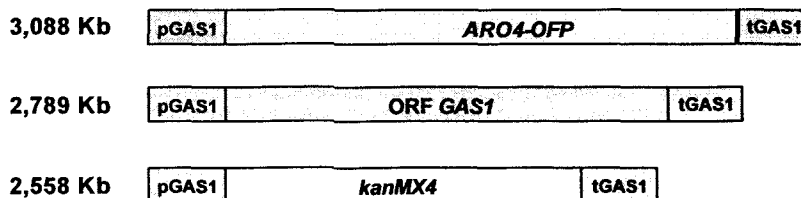
**Figura 37:** Amplificación por PCR del *locus FKS1* a partir de gDNA de diferentes cepas. 1: EC1118, 2: EFD/2-3, 3: EFD-31, 4: T73-4, 5: TFD/2-3, 6: TFD-31. a: *locus* original de *FKS1*, b: *FKS1* deleciónado con *ARO4-OFP*, c: *FKS1* deleciónado con *kanMX4*.

T73-4 fue transformado con DFKS1-3 y se obtuvieron 10 transformantes. La amplificación por PCR del *locus FKS1* mostró para todos ellos una banda correspondiente al alelo *KNR4* deleciónado con el marcador *kanMX4* (figura 37, calle 5). Uno de los transformantes, que se denominó TFD/2-3, fue transformado con el

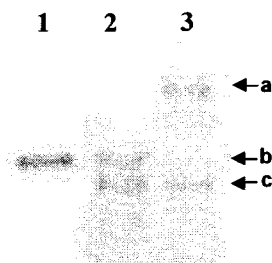
cassette de delección DFKS1-1. Se analizaron 22 transformantes y uno de ellos presentó 3 bandas, dos correspondientes al *locus FKS1* deleccionado con *ARO4-OFP* y *kanMX4* respectivamente, y una tercera banda correspondiente al alelo original, indicando la presencia de al menos 3 copias del gen (figura 37, calle 6). Se seleccionó esta cepa y se denominó TFD-31. Se realizaron varias transformaciones con el cassette de delección DFKS1-2, que contiene el marcador *URA3*, y de cada una de ellas se analizaron al menos 22 transformantes pero no se obtuvo ninguno con el cassette insertado en el *locus FKS1* (no se muestran los datos). En vista de este resultado, se abandonó la construcción de la cepa de fondo genético T73-4 deleccionada en todas las copias de *FKS1*.

#### 2.4. Construcción de cepas deleccionadas en *GAS1*.

T73-4 se transformó con el cassette de delección DGAS1-3 y se obtuvieron 18 transformantes. Todos ellos presentaron dos bandas, una correspondiente al *locus GAS1* silvestre y otra correspondiente al *locus* deleccionado con *kanMX4* (figuras 38 y 39). original y todos ellos presentaron una copia deleccionada con *kanMX4*. Se seleccionó uno de ellos al que se denominó TGASD/2-3 y se utilizó para ser transformado con el cassette de delección DGAS1-1. Se analizaron 22 transformantes, uno de los cuales no presentaba copia del alelo silvestre y sí de las copias deleccionadas con *ARO4-OFP* y *kanMX4*. Se seleccionó este transformante y se denominó TGASD-31.



**Figura 38:** Tamaño de los fragmentos posibles en la amplificación del *locus GAS1* mediante PCR.



**Figura 37:** Amplificación por PCR del locus *GAS1* a partir de gDNA de diferentes cepas. 1: T73-4, 2: TGASD/2-3, 3: TGASD-31. a: *GAS1* delecionado con ARO4-OFP, b: locus original de *GAS1*, c: *GAS1* delecionado con *kanMX4*.

De la transformación de EC1118 con el cassette de delección DGAS1-3 se obtuvieron 9 transformantes y todos ellos presentaron una copia del gen *GAS1* delecionada con *kanMX4* (no se muestran los datos). Se seleccionó uno de los transformantes que se denominó EGASD/2-3 y se utilizó para ser transformado con el cassette de delección DGAS1-1, que contiene el marcador ARO4-OFP. Se analizaron 22 transformantes y ninguno de los transformantes mostró la delección de las dos copias de *GAS1*. Tras varios intentos con el mismo resultado, finalmente se optó por abandonar la construcción de la cepa EC1118 delecionada en todas las copias *GAS1*.

## 2.5. Discusión de la delección de los genes en las cepas industriales.

La delección de todas las copias de los cuatro genes en dos cepas industriales diferentes implicó un gran número de manipulaciones, constituyendo sin duda la tarea más laboriosa del estudio. En la delección de cada copia se utilizó un cassette de delección diferente y para su construcción fue necesario clonar hasta tres fragmentos: el promotor, el gen marcador y el terminador. La técnica descrita por Geiser et al. (2001) empleada para este efecto resultó ser muy conveniente debido a la facilidad que supone para clonar fragmentos. La disponibilidad de las cepas de la colección Euroscarf, cuyos genes se hayan delecionados con el marcador *kanMX4*, supuso una ventaja dado que para la delección de *GPI7*, *FKS1* y *GAS1* con ese marcador, no fue necesario construir un cassette de delección específico.

Salvo excepciones, la delección de cada copia de los genes se obtuvo a partir de una única transformación. Esto indica que la elección de regiones de 500 pb correspondientes al promotor y al terminador de los genes respectivamente, permitieron la recombinación homóloga en los *loci* diana con una elevada frecuencia. Esto fue especialmente relevante en la utilización de los cassettes de delección que contenían los marcadores *URA3* y *ARO4-OFD*, ya que ambos se encuentran en el genoma de *Saccharomyces*. Por lo tanto, la recombinación homóloga podría producirse en sus *loci* en lugar de en los genes diana, obteniéndose con una elevada frecuencia transformantes no delecionados en los genes de interés. De hecho, de la transformación en la que se empleó el cassette de delección DKNR4-2, solamente el 10% de los transformantes presentaron inserción en el *locus KNR4*.

La utilización del alelo *ARO4-OFD* como marcador presenta teóricamente el mismo problema que *URA3*, hecho que puede verse agravado debido al mayor tamaño del gen *ARO4* frente al de *URA3* (aproximadamente 2 kb frente a 1 kb respectivamente). Añadido a esto, la resistencia del alelo *ARO4-OFD* es debida al cambio de un único nucleótido, lo que permite la aparición de mutantes espontáneos con una elevada frecuencia. De hecho, en la mayoría de los casos sucedió de este modo ya que se obtuvieron colonias resistentes a PFP procedentes de transformaciones sin cassette de delección. Sin embargo, a pesar de estos factores adversos, la frecuencia de recombinación en los diferentes *loci* fue muy superior a la registrada por *URA3*.

La utilización del marcador *kanMX4* permitió frecuencias de inserción muy superiores a las obtenidas con *URA3* y *ARO4-OFD*. Esto fue especialmente relevante en la construcción de la cepa delecionada en todas las copias de *KNR4* sobre el fondo genético de T73-4, debido a las tres copias presentes en su genoma. La transformación de la cepa TKD-12 con el cassette de delección DKNR4-3 dio como resultado 12 transformantes, 10 de los cuales mostraron la integración del cassette en el *locus*, convirtiéndolo en un muy buen marcador de selección para la delección de genes. Su aplicación industrial sin embargo, está limitada por el rechazo que genera en los consumidores el empleo de marcadores que confieren resistencias a antibióticos.

Tanto para los genes *KNR4* como *GPI7* se consiguieron construir cepas delecionadas en todas las copias en los dos fondos genéticos empleados, posibilitando el

estudio del fenotipo en función del fondo genético. El objetivo fue el mismo para los genes *FKS1* y *GAS1*, sin embargo dificultades en la construcción de algunas cepas nos hicieron finalmente desistir de este objetivo. En EC1118 se consiguieron delecionar todas las copias del gen *FKS1*, sin embargo la presencia de al menos una tercera copia en T73-4 no permitió hacer lo mismo en este fondo genético. Se delecionó una primera copia con el marcador *kanMX4* dando lugar a la cepa TFD/2-3 y una segunda copia con *ARO4-OFP* dando lugar a la cepa TFD-31. Esta cepa se transformó en varias ocasiones con el cassette de delección DFKS1-2 que contenía el marcador de selección *URA3*. Se obtuvieron transformantes en todos los casos pero ninguno de ellos presentó la inserción en el locus *FKS1*. A falta de un análisis que lo confirme, es muy probable que los transformantes tuvieran reemplazado el locus *URA3* inactivo presente en el genoma de T73-4, por la copia activa presente en el cassette de delección. Considerando la baja probabilidad de reemplazo de la copia activa de *FKS1* de entre al menos 3 copias totales, y la baja frecuencia de inserción de los cassettes de delección que contenían el marcador *URA3*, se optó por abandonar la construcción de la cepa delecionada en todas las copias de *FKS1* en fondo T73-4. Cabe señalar sin embargo, a tenor de lo observado en la construcción de la cepa TKD-123, que la construcción de la cepa delecionada en todas las copias de *FKS1* en fondo T73-4, podría haber sido posible si el orden de los marcadores empleado hubiera sido diferente.

La construcción de la cepa delecionada en todas las copias de *GAS1* en el fondo genético de EC1118 tampoco fue posible. Se eliminó una de las copias usando el marcador *kanMX4* dando la cepa EGASD/2-3 que se transformó con el cassette DGAS1-1. Sin embargo, en ningún caso se consiguió eliminar la segunda copia de *GAS1*. Al disponerse la cepa delecionada en todas las copias en fondo T73-4, se abandonó el intento de realizar lo mismo en EC1118.

### 3. CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS INDUSTRIALES CONSTRUIDAS.

La caracterización de las cepas industriales construidas consistió en primer lugar en el estudio de la liberación de manoproteínas en condiciones de laboratorio. Posteriormente se realizaron fermentaciones de mostos naturales estudiando el poder fermentativo de las diferentes cepas y analizando los vinos obtenidos.

#### 3.1. Estudio de la liberación de polisacáridos en condiciones de laboratorio.

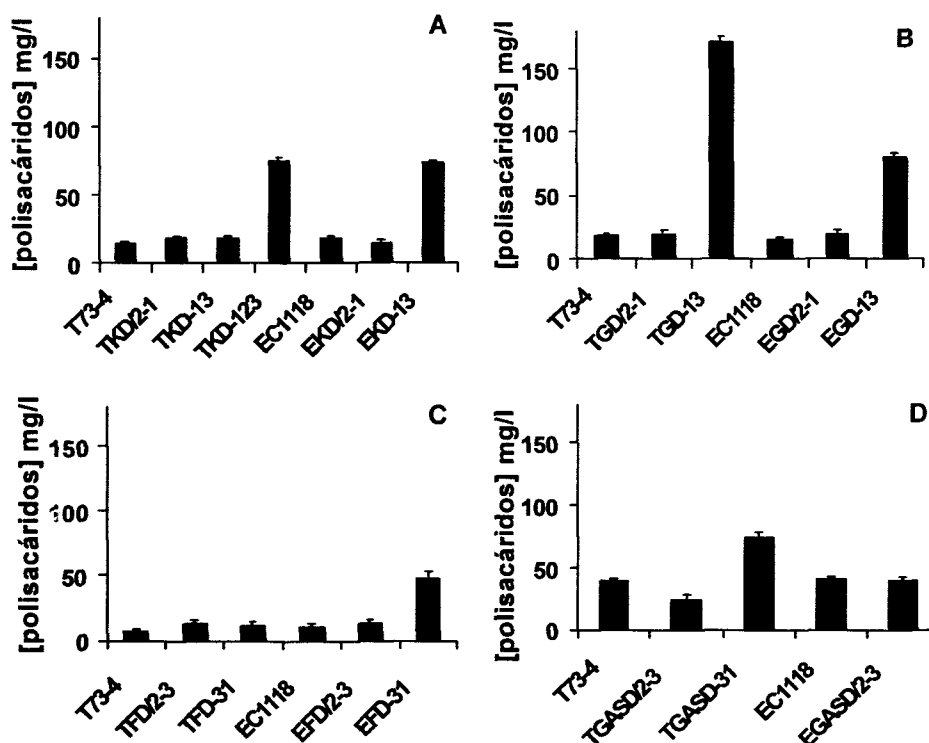
Las cepas se crecieron en medio GCY hasta alcanzar la fase estacionaria y su comportamiento fue similar al observado para las cepas de laboratorio. Las cepas delecionadas en todas las copias de los genes, presentaron una velocidad de crecimiento inferior que sus respectivas cepas parentales. Asimismo, la  $DO_{600}$  de bs cultivos al alcanzar la fase estacionaria, fue también menor. En la tabla 4 se muestra a modo de ejemplo los datos de crecimiento obtenidos por las cepas delecionadas en *KNR4* y sus cepas parentales correspondientes.

**Tabla 4:** Tiempo invertido en alcanzar la fase estacionaria y  $DO_{600}$  alcanzada por parte de las cepas delecionadas en *KNR4* y sus respectivas cepas parentales.

Cepa	Tiempo en alcanzar la fase estacionaria (h)	$DO_{600}$ al alcanzar la fase estacionaria
TKD/2-1	16	12,9
TKD-12	19	13,15
TKD-123	22	6,45
T73-4	14	13,4
EKD/2-1	16	7,7
EKD-13	22	8,1
EC1118	14	13,05

Para las cepas delecionadas en el resto de genes el resultado fue similar (no se muestran los datos), aquellas cepas delecionadas en todas las copias presentaron un crecimiento más lento y una  $DO_{600}$  al alcanzar la fase estacionaria menor que sus respectivas cepas parentales.

El resultado de la medida de la concentración de polisacáridos en el sobrenadante de los cultivos, fue también muy similar al observado para las cepas de laboratorio (figura 38).



**Figura 38:** Polisacáridos liberados durante el crecimiento en GCY por parte de las cepas industriales construidas. **A:** Cepas delecionadas en *KNR4* y sus controles. **B:** Cepas delecionadas en *GPI7* y sus controles. **C:** Cepas delecionadas en *FKS1* y sus controles. **D:** Cepas delecionadas en *GAS1* y sus controles.

Las cepas delecionadas en todas las copias de los genes presentaron una concentración de polisacáridos significativamente superior a la liberada por las cepas control. Por otra parte, las cepas con al menos una copia activa de alguno de los genes, presentaron un fenotipo indistinguible de las cepas silvestres, confirmando la recesividad del fenotipo asociado a la deleción de los cuatro genes.

La deleción de *KNR4* dio como resultado una liberación de polisacáridos muy similar en los dos fondos genéticos realizada, liberando ambas cepas una concentración entre 4 y 5 veces superior a la de sus respectivas cepas parentales. A tenor de estos resultados, el efecto del fondo genético sobre el fenotipo asociado a la deleción de *KNR4*, observado en las cepas de laboratorio, no se ha producido en las dos cepas industriales utilizadas. En cuanto a la deleción de *GPI7* sí se observa un efecto del



fondo genético, aunque a diferencia de lo observado en condiciones de laboratorio, ambas cepas industriales delecionadas liberan más polisacáridos que sus respectivas cepas parentales. TGD-13 liberó hasta 9 veces más polisacárido que T73-4, siendo además la cepa construida que mayor liberación produjo, y EGD-13 liberó solamente 5 veces más (figura 38 B).

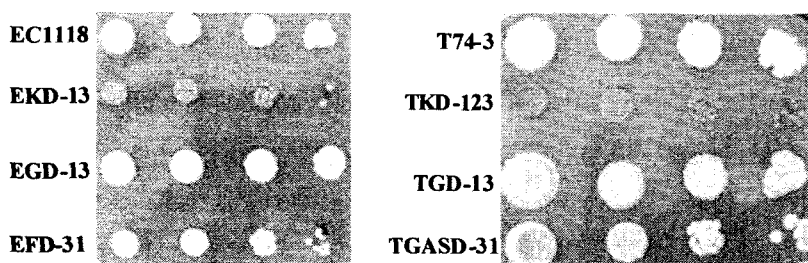
La deleción de todas las copias de *FKSI* en EC1118, dio lugar a un fenotipo muy similar al observado en cepas de laboratorio: la cepa delecionada liberó una cantidad de polisacáridos en torno a 4 veces superior a la liberada por la cepa control (figura 38 C).

La cepa TGASD-31 liberó una cantidad de polisacáridos ligeramente superior a la liberada por T73-4 (figura 38 D), contrastando además con el resultado obtenido en cepas de laboratorio, en la que la deleción de *GASI* supuso en los dos casos estudiados una liberación muy aumentada. En todos los experimentos realizados, los cultivos de las cepas mutantes se crecieron en paralelo, y fueron centrifugados cuando la cepa más lenta alcanzó la fase estacionaria. Todas las cepas delecionadas en todas las copias de los genes, mostraron un crecimiento más lento, sin embargo, TGASD-31 fue la cepa que mostró defectos en el crecimiento más acusados. De este modo, al alcanzar TGASD-31 la fase estacionaria, el resto de cepas crecidas en paralelo llevaban ya varias horas en fase estacionaria. Durante este tiempo se habría producido una liberación paulatina de polisacáridos, haciendo que la concentración liberada por los controles fuera mayor que en otros experimentos, y disminuyendo así las diferencias con TGASD-31.

### **3.2. Determinación de la capacidad autolítica.**

Las deleciones de los cuatro genes realizadas, implican alteraciones en la pared celular que en algunos casos se traducen en una mayor fragilidad de la misma. Una pared celular más frágil podría dar lugar a una mayor tendencia a un fenotipo de autólisis. Este fenotipo podría influir en el resultado de la fermentación de mostos naturales, de modo que conocerlo previamente ayudaría a interpretar los resultados de esas fermentaciones. Por ello, se estudió el fenotipo autolítico de las cepas construidas en comparación con sus cepas parentales. Este estudio, así como todos los que se

presentarán a partir de ahora, se realizó solamente con las cepas delecionadas en todos los genes, ya que solamente éstas presentaron una mayor liberación de polisacáridos en condiciones de laboratorio. Para ello se utilizaron placas de YPD que contenían 40 µg/ml de BCIP, un sustrato de la fosfatasa alcalina que cataliza su hidrólisis, dando lugar a un compuesto de color azulado. De este modo, las cepas más autolíticas liberarán más fosfatasa alcalina y las colonias que formen presentarán una coloración azul más intensa. Las diferentes cepas se crecieron en YPD y a partir de estos cultivos se inocularon en placas de YPD+BCIP, gotas con diferentes concentraciones de células. El resultado obtenido tras cuatro días de incubación a 20°C es el que se muestra en la figura 39.



**Figura 39:** Determinación del fenotipo autolítico de las cepas industriales delecionadas en todas las copias de los genes.

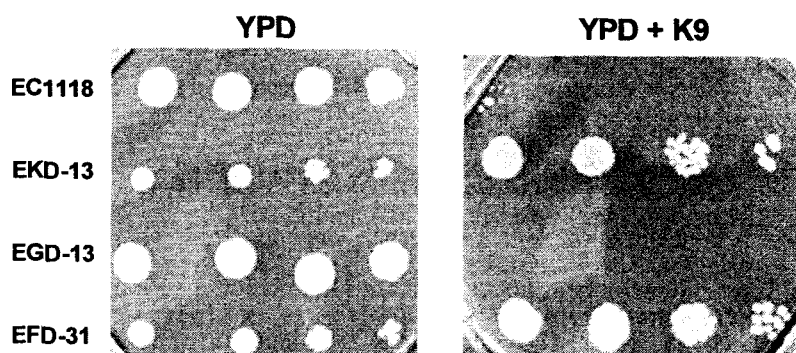
La deleción de *KNR4* da lugar a un fenotipo más autolítico que las respectivas cepas parentales en los dos fondos genéticos en los que se realizó. La deleción de *GAS1* también da lugar a un fenotipo más autolítico aunque este es menos severo que en las cepas delecionadas en *KNR4*. En el caso de *GPI7* el fondo genético sí que parece influenciar este fenotipo ya que mientras se observa una ligera coloración azulada en la cepa TGD-13, EGD-13 muestra una coloración indistinguible de su cepa parental. Por último, EFD-31 presenta una coloración ligeramente azulada respecto a EC1118 indicando que su fenotipo autolítico sería muy leve.

Un fenotipo más autolítico podría implicar mayores dificultades de fermentación de un mosto. Por otro lado, varias características organolépticas están relacionadas con los compuestos liberados por las levaduras durante la autólisis, de modo que podría tener un efecto positivo sobre la calidad del vino.

### 3.3. Determinación de la resistencia a la toxina K9.

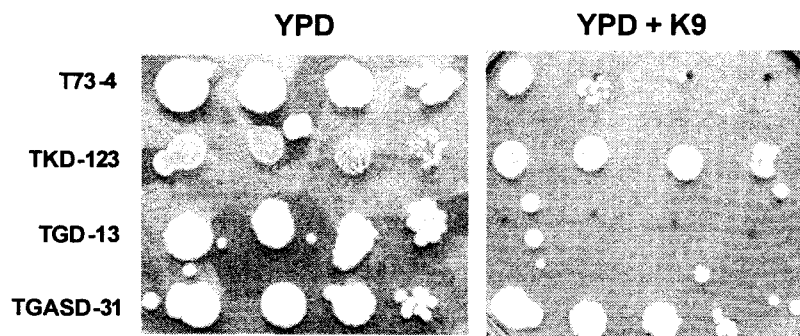
El gen *KNR4* (de *killer nine resistant*) se identificó porque su delección da lugar a una resistencia a la toxina K9 producida por *Williopsis saturnus* var. *mrakii*, que inhibe la síntesis del  $\beta$ -1,3-glucano (Yamamoto *et al.* 1986, 1988). Estudiar la resistencia de las cepas EKD-13 y TKD-123 a la toxina serviría como confirmación del fenotipo. Por otro lado, estas cepas liberarían más manoproteínas y serían resistentes a K9, de modo que sería interesantes determinar si estos dos factores están correlacionados. Para ello, se determinó la resistencia a K9 del resto de cepas industriales construidas, que presentaron una liberación de manoproteínas aumentada.

Tanto EKD-13 como TKD-123 presentaron crecimiento en YPD + K9 mientras que sus controles no crecieron (figuras 40 y 41), confirmando el fenotipo de resistencia a K9 asociado a la delección de *KNR4*.



**Figura 40:** Crecimiento en YPD y en YPD+ K9 de las cepas con fondo genético de EC1118 delecionadas en todas las copias de los genes *KNR4*, *GPI7* y *FKS1*.

Las cepas delecionadas en *GPI7* al igual que sus controles presentaron un crecimiento nulo en el mismo medio de cultivo (figuras 40 y 41). Por otro lado, tanto EFD-31 como TGASD-31 delecionadas en *FKS1* y *GAS1* respectivamente, presentaron un crecimiento en YPD + K9 muy similar al de las cepas delecionadas en *KNR4*.



**Figura 41:** Crecimiento en YPD y en YPD+ K9 de las cepas con fondo genético de T73-4 delecionadas en todas las copias de los genes *KNR4*, *GPI7* y *GAS1*.

Los genes *KNR4*, *FKS1* y *GAS1* están implicados en la síntesis y remodelación del  $\beta$ -1,3-glucano (Douglas *et al.* 1994, Mazur *et al.* 1995, Popolo *et al.* 1999, Mouyna *et al.* 2000, Klis *et al.* 2002), y su ausencia está asociada a alteraciones en la estructura y composición de la pared celular, concretamente a una disminución de la concentración del  $\beta$ -1,3-glucano y un aumento en quitina y manoproteínas (Douglas *et al.* 1994, Popolo *et al.* 1999, Mouyna *et al.* 2000, Klis *et al.* 2002, Lagorce *et al.* 2006). Para la deleción de *GPI7* sin embargo, no se han descrito estas alteraciones en la composición de la pared celular. Por lo tanto, la composición alterada de la pared celular, común a la deleción de *KNR4*, *FKS1* y *GAS1*, estaría en el origen de la resistencia a K9. Al disminuirse la concentración de  $\beta$ -1,3-glucano, aunque su síntesis se viera impedida por la toxina, la viabilidad celular no se vería afectada debido a su menor presencia del  $\beta$ -1,3-glucano en la pared. Por otro lado, el aumento en la concentración de manoproteínas, reduciría la permeabilidad de la pared, limitando el acceso de la toxina K9 a la capa de  $\beta$ -1,3-glucano, haciendo a las células más resistentes.

### 3.4. Estudio de la capacidad fermentativa en mostos naturales.

Una característica importante en cepas vínicas de *S. cerevisiae* es su capacidad fermentativa, ya que deben ser capaces de fermentar mostos con concentraciones de azúcar de en torno al 20% (p/v). Una vez demostrada la mayor liberación de polisacáridos en condiciones de laboratorio de las cepas construidas, fue necesario determinar dos características relacionadas con su aplicación en vinificación. En los estudios de crecimiento realizados en condiciones de laboratorio, se observó para

algunas de las cepas un crecimiento reducido frente al de su cepa parental. De este modo, estas cepas con un crecimiento más reducido, podrían presentar dificultades para fermentar un mosto natural. Por ello, estudiar la capacidad fermentativa en mostos naturales de las cepas construidas, es importante para determinar su aplicabilidad a procesos de fermentación industriales. Por otro lado, determinados parámetros inherentes a las condiciones de crecimiento tales como el modo de cultivo, la composición del medio, la concentración de O<sub>2</sub> disponible, la naturaleza de la fuente de carbono, el pH o la temperatura, pueden influir sobre la composición de la pared celular (Aguilar-Uscanga *et al.* 2003). Así, el medio y las condiciones de cultivo durante la fermentación del vino, podrían tener efecto sobre la liberación de manoproteínas. Por ello fue necesario determinar si la mayor liberación de manoproteínas observada en condiciones de laboratorio, se da lugar también durante la fermentación de vino natural. Se descartó la medida de polisacáridos totales mediante el método del fenol/sulfúrico como sistema de medida de las manoproteínas presentes en el vino, debido a que la concentración de otros polisacáridos procedentes de la uva podría presentar un fondo muy alto y enmascarar los resultados. Como alternativa a este sistema se utilizó la hibridación con Concanavalina A marcada con Peroxidasa de las manoproteínas presentes en el vino. Además, como sistema indirecto de la medida de la concentración de manoproteínas se determinó la estabilidad proteica de los vinos, siendo este uno de los parámetros a mejorar mediante el aumento en la concentración de manoproteínas.

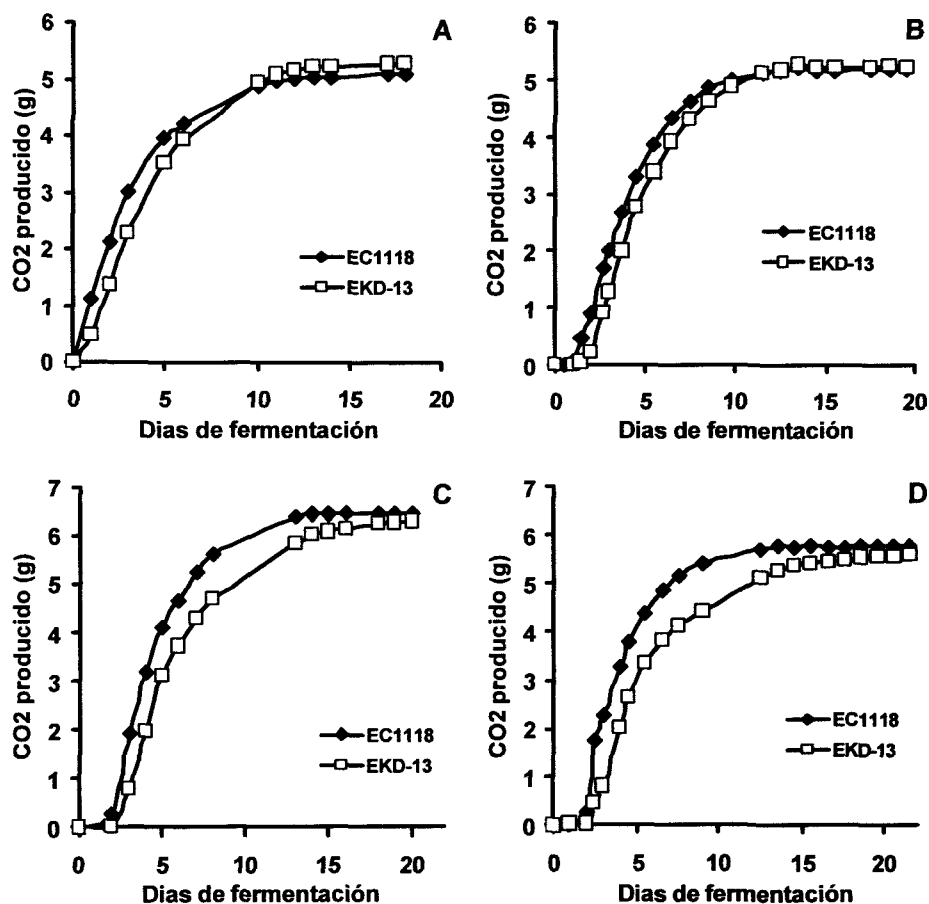
Las cepas utilizadas para estos estudios fueron solamente aquellas con todas las copias deletionadas, dado que solamente estas liberaron más polisacáridos en condiciones de laboratorio. Para las fermentaciones se utilizaron mostos de la variedad de uva *Sauvignon Blanc*, cuyos vinos son susceptibles de generar quiebra proteica. Los mostos utilizados fueron de dos lotes diferentes, uno de la cosecha de 2006 y otro de 2007. Ambos presentaron una concentración de azúcar elevada, de en torno al 33% (p/v) en el caso de la cosecha del 2006, mientras que el de 2007 tenía un contenido en azúcar de en torno al 25% (p/v). Este factor es importante dado que la concentración de las proteínas susceptibles de formar agregados, está correlacionada con la concentración de azúcar en la uva. Por otro lado, la fermentación de dos mostos con concentraciones de azúcares diferentes permitiría determinar su influencia en el desarrollo de las fermentaciones por parte de las cepas deletionadas. Estas se llevaron a cabo en matraces tapados con válvulas Müller y se siguió su evolución registrando la pérdida de peso

asociada a la producción de CO<sub>2</sub>. Se realizaron simultáneamente fermentaciones de las cepas silvestres y de sus mutantes de delección. Cuando la fermentación de la cepa más lenta hubo finalizado, se centrifugaron todos los cultivos para eliminar las células y recoger los vinos.

#### 3.4.1. *Cepas delecionadas en KNR4.*

Con cada una de las cepas delecionadas en *KNR4*, tanto en fondo de EC1118 como de T73-4 se realizaron dos fermentaciones con cada lote de mosto, y cada fermentación se realizó por duplicado. En la figura 42 se muestra la evolución de una fermentación representativa de cada lote, por parte de la cepa EKD-13 respecto a la de EC1118. La fermentación del mosto del lote de 2007 no presentó diferencias entre las dos cepas (figura 42A y B), siendo la velocidad de fermentación prácticamente idéntica en ambos lotes. Si bien en la fermentación A, EC1118 produjo menos etanol, en el resto de fermentaciones del mismo mosto realizadas, las concentraciones de los azúcares residuales, así como del glicerol y etanol producidos, fueron muy similares.

La fermentación del mosto del lote de 2006 sin embargo sí mostró diferencias entre las dos cepas (figura 42 C y D). EKD-13 presentó una velocidad de fermentación más lenta que la de EC1118, sin embargo no parece tener problemas para llevarla a cabo de igual manera que la cepa parental. El análisis de los vinos fermentados mostró cómo la concentración de azúcar residual fue muy similar en las dos cepas, indicando que a pesar de que EKD-13 presente una velocidad de fermentación menor, su capacidad fermentativa no estaría mermada. Cabe señalar que en todas las fermentaciones de mosto de 2006 realizadas (4 en total), para un mismo consumo de azúcares, la concentración de etanol producido por EKD-13 fue hasta un grado menor que la de EC1118, mientras que la concentración de glicerol producido fue de en torno a un 10% superior para la cepa delecionada. Esto, a falta de un análisis más exhaustivo, podría indicar por parte de EKD-13 un desvío hacia la producción de glicerol en detrimento de la de etanol, en determinadas condiciones de cultivo.

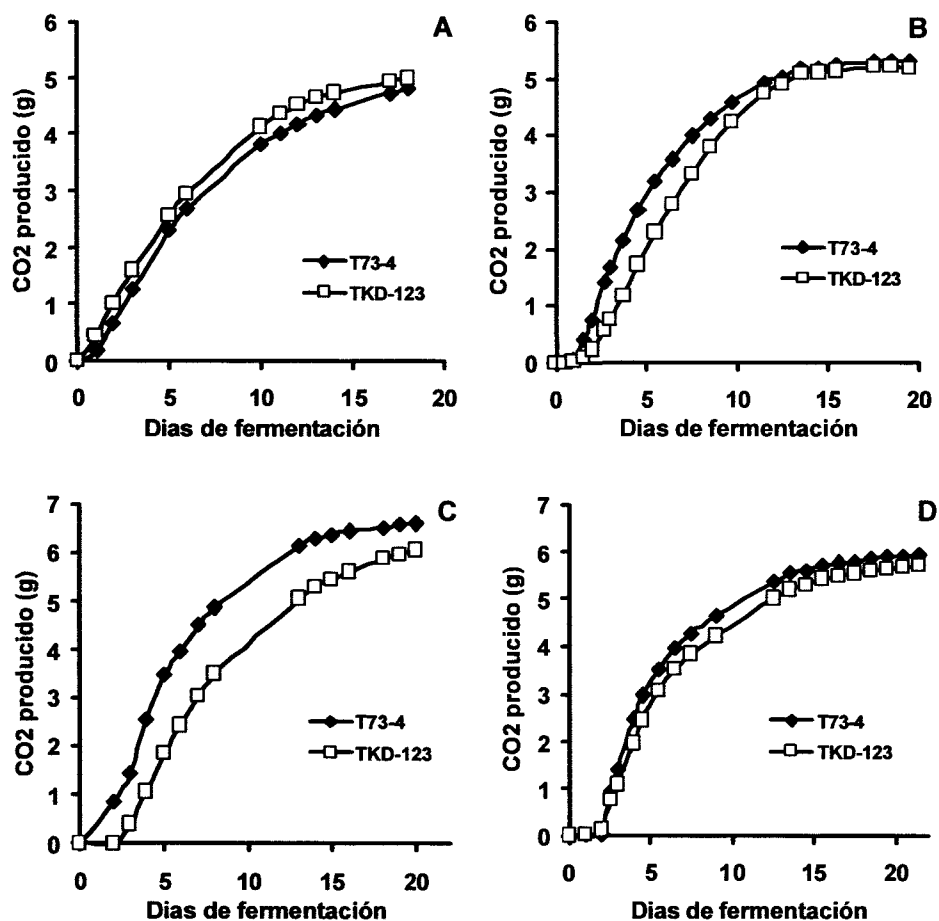


% (p/v)	Fermentación A		Fermentación B		Fermentación C		Fermentación D	
	EC1118	EKD-13	EC1118	EKD-13	EC1118	EKD-13	EC1118	EKD-13
<b>Glucosa</b>	0,34	0,32	0,37	0,37	0,22	0,3	0,26	0,25
<b>Fructosa</b>	0,36	0,4	0,34	0,36	0,31	0,3	0,31	0,25
<b>Glicerol</b>	0,66	0,61	0,6	0,62	0,82	0,91	0,83	0,94
<b>Etanol</b>	12,12	13,6	13,62	13,6	16,94	16,17	17,38	16,39

**Figura 42:** Cinética de fermentación de varios mostos *Sauvignon Blanc* fermentados por la cepa EKD-13 y EC1118. Las figuras A y B corresponden a dos fermentaciones de mosto de 2007 (25% (p/v) de azúcar) y, C y D de mosto 2006 (33 % (p/v) de azúcar). En la tabla se indican las concentraciones de glucosa, fructosa, glicerol y etanol de los diferentes vinos.

La delección de *KNR4* en fondo genético de T73-4 parece tener un efecto sobre la capacidad fermentativa similar al que tiene sobre EC1118. En la fermentación del mosto de 2007 apenas hubo diferencias en la velocidad de fermentación de TKD-123 y la cepa parental. En el primer lote (figura 43A) la cepa delecionada presentó una velocidad de fermentación prácticamente idéntica a la de T73-4, y el análisis de los vinos fermentados además no mostró grandes diferencias respecto a los azúcares residuales ni respecto al glicerol y etanol producidos. En una segunda fermentación del mosto de

2007 (figura 43B) la velocidad de TKD-123 fue ligeramente inferior a la de T73-4, sin embargo la cantidad de azúcares residuales fue muy similar para las dos cepas. Cabe destacar que para la misma cantidad de azúcares consumidos la concentración de glicerol producida por TKD-123 fue un 35% superior a la de T73-4, en detrimento de la concentración de etanol que fue medio grado menor.



% (p/v)	Fermentación A		Fermentación B		Fermentación C		Fermentación D	
	T73-4	TKD-123	T73-4	TKD-123	T73-4	TKD-123	T73-4	TKD-123
Glucosa	0,32	0,31	0,37	0,35	0,28	0,35	0,26	0,25
Fructosa	0,13	0,16	0,36	0,38	0,28	0,35	0,24	0,21
Glicerol	0,68	0,68	0,6	0,81	0,76	0,87	0,78	0,88
Etanol	13,28	13,48	13,86	13,34	16,9	15,75	17,26	16,39

**Figura 43:** Cinética de fermentación de varios mostos *Sauvignon Blanc* fermentados por la cepa TKD-123 y T73-4. Las figuras A y B corresponden a dos fermentaciones de mosto de 2007 (25% (p/v) de azúcar) y, C y D de mosto 2006 (33 % (p/v) de azúcar). En la tabla se indican las concentraciones de glucosa, fructosa, glicerol y etanol de los diferentes vinos.



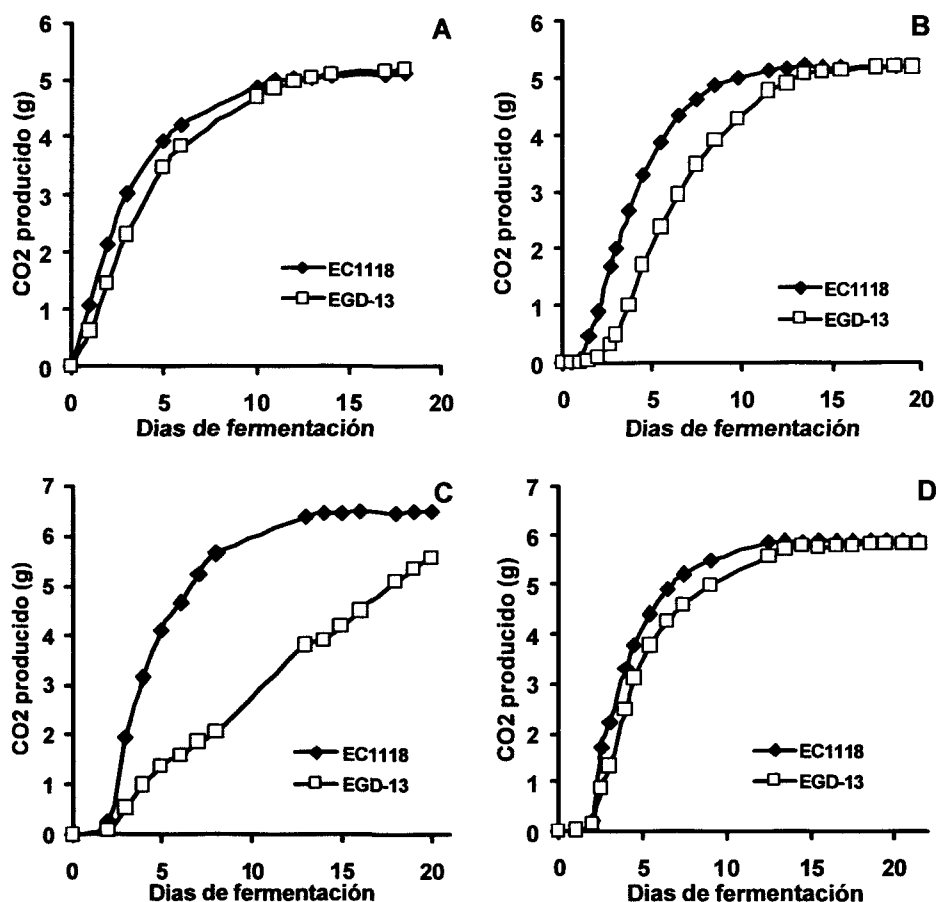
Las dos fermentaciones realizadas con mosto de 2006 mostraron resultados diferentes (figura 43 C y D). En la primera, la velocidad de fermentación de TKD-123 fue claramente inferior a la de T73-4 y la concentración de azúcares residuales fue mayor en el caso de la cepa delecionada. Al haber consumido menos azúcares, la cantidad de etanol producido por TKD-123 fue lógicamente menor que la producida por la control. Sin embargo, a pesar de haberse consumido menos, la concentración de glicerol producido fue más alta que en el caso de la control, mostrando la tendencia ya observada anteriormente.

En la segunda fermentación del mosto de 2006 ambas cepas presentaron una velocidad de fermentación similar y consumieron la misma cantidad de azúcares. Sin embargo al igual que lo observado anteriormente la concentración de glicerol producida por la cepa delecionada en *KNR4* fue en torno a un 13% superior a la control mientras que la de etanol fue cerca de un grado inferior.

#### 3.4.2. *Cepas delecionadas en GPI7.*

Las fermentaciones realizadas con la cepa delecionada en *GPI7* en fondo genético EC1118, mostraron resultados muy diferentes dependiendo del tipo de mosto usado para su fermentación, pero también entre distintas fermentaciones de un mismo mosto. No se observaron diferencias en la velocidad de fermentación de la primera fermentación del mosto de 2007 (figura 44 A).

La concentración de azúcares residuales fue similar en ambos casos, sin embargo EGD-13 produjo más etanol y un poco menos de glicerol. En la segunda fermentación, habiendo consumido las dos cepas la misma cantidad de azúcares, la concentración de etanol y glicerol producidos fue prácticamente idéntica. La velocidad de fermentación sin embargo fue algo más baja para la cepa delecionada que para EC1118, a diferencia de lo observado en la primera fermentación del mismo tipo de mosto.

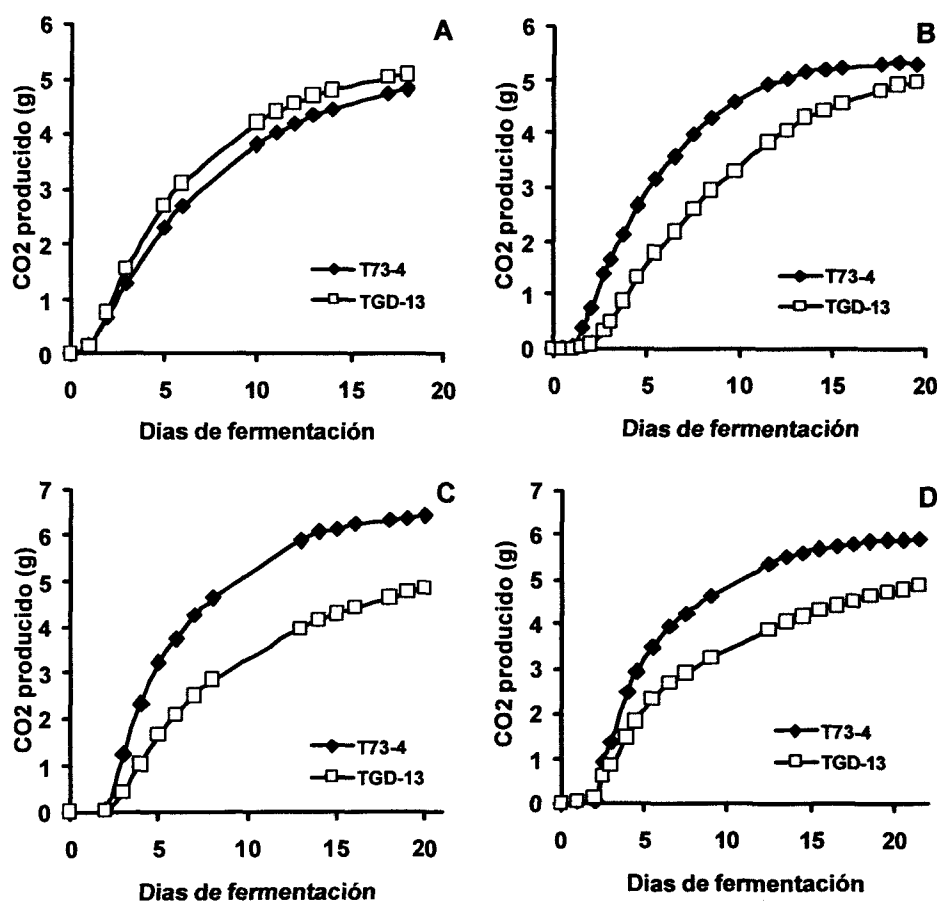


% (p/v)	Fermentación A		Fermentación B		Fermentación C		Fermentación D	
	EC1118	EGD-13	EC1118	EGD-13	EC1118	EGD-13	EC1118	EGD-13
Glucosa	0,34	0,32	0,37	0,38	0,22	n.a.	0,26	0,24
Fructosa	0,36	0,38	0,34	0,38	0,31	n.a.	0,32	0,25
Glicerol	0,66	0,61	0,6	0,6	0,82	n.a.	0,84	0,9
Etanol	12,12	13,81	13,62	13,65	16,94	n.a.	17,25	17,29

**Figura 44:** Cinética de fermentación de varios mostos *Sauvignon Blanc* fermentados por la cepa EGD-13 y EC1118. Las figuras A y B corresponden a dos fermentaciones de mosto de 2007 (25% (p/v) de azúcar) y, C y D de mosto 2006 (33 % (p/v) de azúcar). n.a. (no analizado). En la tabla se indican las concentraciones de glucosa, fructosa, glicerol y etanol de los diferentes vinos.

Las dos fermentaciones realizadas con mosto de 2006 mostraron resultados muy diferentes entre sí (figura 44C y D). En una primera fermentación la cepa delecionada presentó dificultades para llevarla a término (no se tienen datos de azúcares consumidos o de etanol y glicerol producidos), sin embargo una segunda fermentación del mismo mosto fue idéntica para ambas cepas, tanto en velocidad como en concentración de los compuestos analizados.

El resultado de la fermentación del mosto de 2007 por parte de TGD-13 fue similar al observado para EGD-13 (figura 45 A y B). En una de las fermentaciones realizadas no se apreciaron diferencias entre TGD-13 y la control, mientras que en la segunda, la cepa delecionada presentó una velocidad inferior. En ambos casos los azúcares consumidos y los metabolitos producidos fueron similares para ambas cepas.



% (p/v)	Fermentación A		Fermentación B		Fermentación C		Fermentación D	
	T73-4	TGD-13	T73-4	TGD-13	T73-4	TGD-13	T73-4	TGD-13
Glucosa	0,32	0,33	0,37	0,36	0,29	0,36	0,26	0,27
Fructosa	0,13	0,27	0,36	0,36	0,29	0,36	0,24	0,76
Glicerol	0,68	0,59	0,6	0,68	0,75	0,85	0,78	0,89
Etanol	13,28	13,89	13,86	13,28	16,83	12,99	17,26	13,76

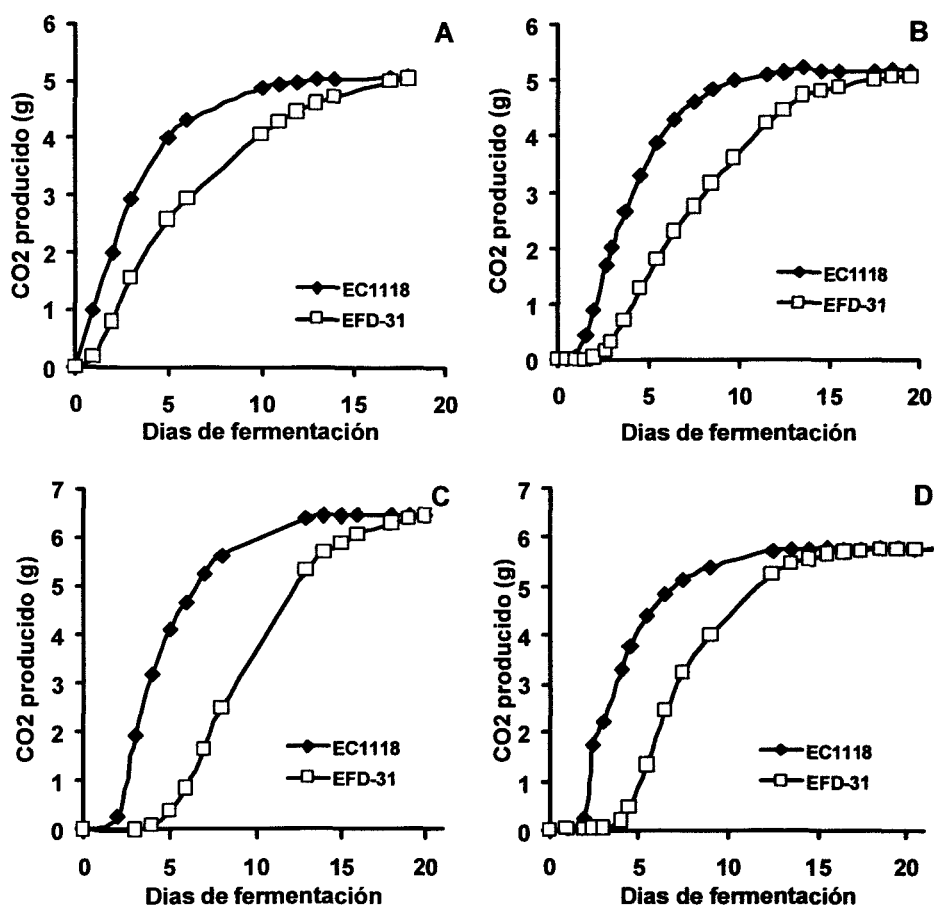
**Figura 45:** Cinética de fermentación de varios mostos *Sauvignon Blanc* fermentados por la cepa TGD-13 y T73-4. Las figuras A y B corresponden a dos fermentaciones de mosto de 2007 (25% (p/v) de azúcar) y, C y D de mosto 2006 (33 % (p/v) de azúcar). En la tabla se indican las concentraciones de glucosa, fructosa, glicerol y etanol de los diferentes vinos.

La cepa TGD-13 presentó una velocidad de fermentación del mosto del 2006 claramente inferior a la de la cepa control, en las dos réplicas realizadas (figura 45 C y D). De hecho, presentó dificultades para llevarla a término teniendo en cuenta la mayor cantidad de azúcar residual respecto a la control, y también la cantidad de etanol producido, muy inferior al producido por T73-4.

#### 3.4.3. *Cepas delecionadas en FKS1.*

La cepa EFD-31 presentó una cinética de fermentación muy similar en todos los cassos. La deleción de *FKS1* afecta negativamente a la velocidad de fermentación ya que ésta fue siempre inferior a la de EC1118 (figura 46).

La capacidad fermentativa sin embargo no parece verse afectada de la misma manera que la velocidad, ya que salvo en la primera fermentación del mosto de 2007 (figura 46 A) en la que la concentración de etanol producido fue menor que en el caso de EC1118, en el resto de los casos no se apreciaron diferencias importantes en la cantidad de etanol producido. Cabe destacar de los resultados de las fermentaciones del mosto de 2006 la mayor concentración de glicerol producido por EFD-31, algo ya observado para la fermentación de este mismo mosto por parte de cepas delecionadas en otros genes.

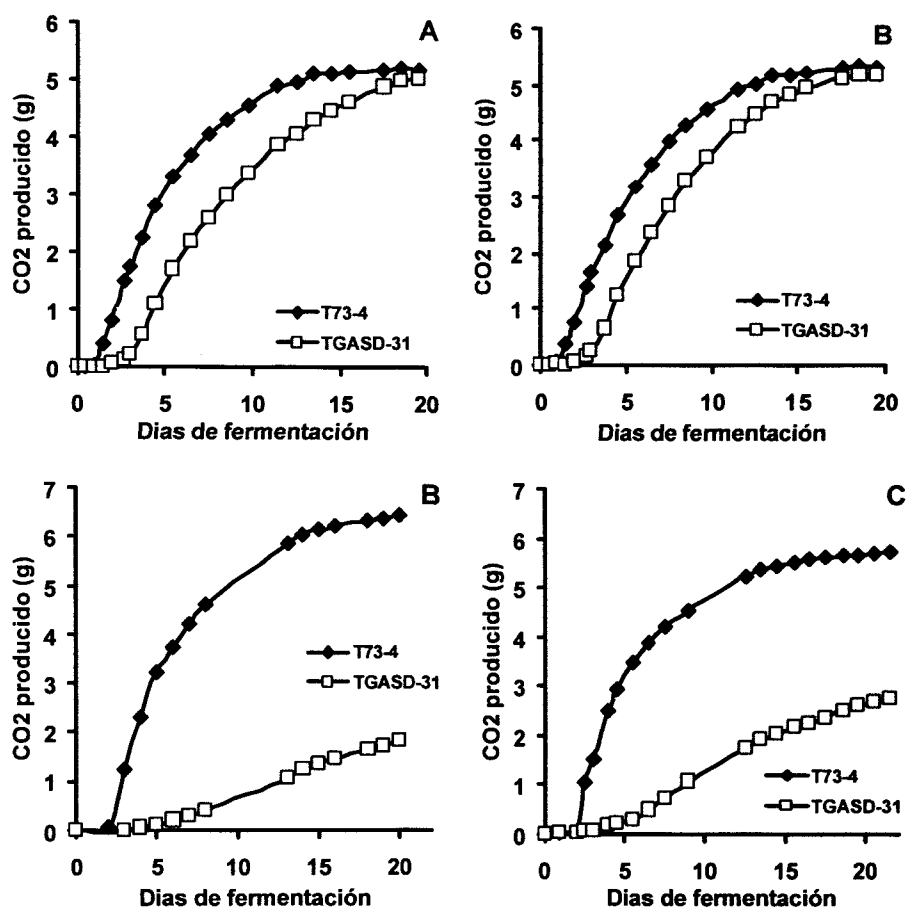


% (p/v)	Fermentación A		Fermentación B		Fermentación C		Fermentación D	
	EC1118	EFD-31	EC1118	EFD-31	EC1118	EFD-31	EC1118	EFD-31
Glucosa	0,32	0,34	0,37	0,33	0,22	0,34	0,26	0,26
Fructosa	0,23	0,15	0,34	0,24	0,31	0,34	0,31	0,26
Glicerol	0,63	0,6	0,6	0,67	0,82	1	0,83	0,96
Etanol	13,88	12,2	13,62	13,38	16,94	16,71	17,38	17,4

**Figura 46:** Cinética de fermentación de varios mostos *Sauvignon Blanc* fermentados por la cepa EFD-31 y EC1118. Las figuras A y B corresponden a dos fermentaciones de mosto de 2007 (25% (p/v) de azúcar) y, C y D de mosto 2006 (33 % (p/v) de azúcar). En la tabla se indican las concentraciones de glucosa, fructosa, glicerol y etanol de los diferentes vinos.

#### 3.4.4. Cepas delecionadas en *GAS1*.

Las cepas de laboratorio delecionadas en *GAS1* analizadas en la primera fase del estudio, presentaron un claro defecto de crecimiento en los dos fondos genéticos estudiados (no se muestran los datos). Los estudios realizados en condiciones de laboratorio con la cepa TGASD-31 confirmaron además este hecho, de modo que sería esperable observar un comportamiento similar en la fermentación de un vino natural por parte de esta cepa. En efecto, las fermentaciones realizadas con los dos tipos de mosto diferentes mostraron este resultado. La fermentación del mosto de 2007 por parte de TGASD-31 fue más lenta que la de T73-4 aunque ambas cepas la llevaron a término de un modo similar (figura 47 A y B). No obstante, a pesar de obtenerse concentraciones de azúcares similares en ambas fermentaciones, la concentración de etanol fue contraria. Mientras que en la primera fermentación la cepa delecionada en *GAS1* produjo más etanol, en la segunda sucedió al contrario, indicando una elevada variabilidad entre fermentaciones de un mismo mosto. Con el mosto más concentrado en azúcar sin embargo no sucedió lo mismo y la cepa delecionada en *GAS1* no solamente presentó una velocidad de fermentación inferior, sino que mostró dificultades para llevarla a término (figura 47 C y D).



% (p/v)	Fermentación A		Fermentación B		Fermentación C		Fermentación D	
	T73-4	TGASD-31	T73-4	TGASD-31	T73-4	TGASD-31	T73-4	TGASD-31
Glucosa	0,39	0,33	0,37	0,34	0,29	0,35	0,25	8,53
Fructosa	0,39	0,33	0,36	0,34	0,29	9,39	0,23	5,56
Glicerol	0,6	0,69	0,6	0,74	0,75	1,04	0,77	0,99
Etanol	12,8	13,41	13,86	11,22	16,83	7,61	16,98	7,49

**Figura 47:** Se muestra la cinética de fermentación de varios mostos *Sauvignon Blanc* fermentados por la cepa TGASD-31 y T73-4. Las figuras A y B corresponden a dos fermentaciones de mosto de 2007 (25% (p/v) de azúcar) y, C y D de mosto 2006 (33 % (p/v) de azúcar). En la tabla se indican las concentraciones de glucosa, fructosa, glicerol y etanol de los diferentes vinos.

#### 3.4.5. Discusión de los resultados.

Como ya se ha comentado, la capacidad fermentativa es un factor importante en las cepas vínicas de *S. cerevisiae*. Las cepas industriales delecionadas en todas las copias de los diferentes genes, presentaron defectos en el crecimiento en los experimentos realizados en condiciones de laboratorio. Por ello, habría sido esperable que la fermentación de un mosto natural, que supone condiciones más restrictivas, se viera también afectada. Sin embargo, durante la elaboración del vino una parte importante de los azúcares presentes en el mosto son fermentados por las levaduras una vez alcanzada la fase estacionaria, cuando ya no hay crecimiento celular. De este modo, podría darse el caso de que las cepas mutantes a pesar de no alcanzar concentraciones celulares tan elevadas como las cepas parentales, fueran metabólicamente activas y consiguieran fermentar los azúcares presentes en el mosto. Ese podría ser el caso de varias de las cepas construidas ya que aunque en determinadas condiciones pueden mostrar una menor velocidad de fermentación, la concentración de azúcares residuales es muy similar a la de las cepas parentales.

La delección de *KNR4* no parece afectar en gran medida la capacidad de fermentación de las levaduras en los dos fondos genéticos estudiados. Solamente en la fermentación del mosto con una concentración muy elevada de azúcares (33% (p/v)), se observa un ligero descenso en la velocidad de fermentación pero sin dar lugar a grandes diferencias en la concentración de los azúcares residuales.

El caso del efecto de la delección de *GPI7* sobre la capacidad de fermentación no parece tan claro, ya que se han encontrado diferencias entre diferentes fermentaciones de un mismo mosto y también entre diferentes mostos. En la mayoría de los casos se ha encontrado una ralentización de la fermentación que sería debida a factores no controlados durante el desarrollo de las fermentaciones.

El comportamiento de la única cepa delecionada en *FKS1* ha seguido un patrón muy homogéneo ya que su velocidad de fermentación ha sido en todos los casos menor que la de EC1118. Al igual que en las cepas arriba mencionadas, la concentración de azúcares residuales ha sido muy similar entre la cepa mutada y la control.



La delección de *GAS1* parece tener un efecto más severo sobre la fermentación que el resto de genes. TGASD-31 es capaz de fermentar el mosto con 25% (p/v) de azúcar aunque más lentamente que la cepa control. Con el mosto con 33% (p/v) de azúcar sin embargo encuentra más dificultades, no siendo capaz de llevar la fermentación a término.

Un efecto común a la delección de todos los genes, fue una tendencia a aumentar la concentración de glicerol respecto a las cepas parentales, especialmente en la fermentación del mosto con 33% (p/v) de azúcar. Este es un hecho que requiere un análisis estadístico exhaustivo para demostrar su significatividad pero podría ser un mecanismo de respuesta ante alteraciones en la pared en determinadas condiciones de cultivo.

El hecho de que la composición de la pared celular de las cepas mutantes esté alterada podría ser la causa de una menor tasa de crecimiento y consiguientemente una menor velocidad de fermentación. En las cepas delecionadas en *KNR4*, *FKS1* y *GAS1*, la cantidad de  $\beta$ -1,3-glucano en la pared está disminuida mientras que la de quitina y manoproteínas está aumentada. Por un lado, a diferencia de la glucosa que compone el  $\beta$ -1,3-glucano, tanto la N-acetil glucosamina que compone la quitina como los aminoácidos de las manoproteínas contienen nitrógeno. Al aumentar la cantidad de quitina y manoproteínas en la pared, el requerimiento de nitrógeno también se vería aumentado, y las reacciones implicadas en el metabolismo del nitrógeno podrían estar en el origen de la ralentización del crecimiento celular. Por otro lado, la síntesis de estos compuestos, especialmente la de la quitina podría ser más lenta que la del  $\beta$ -1,3-glucano, ralentizando también el crecimiento celular. La quitina se encuentra en condiciones normales en un 1-2% en la pared celular, y las enzimas implicadas en su síntesis estarían adaptadas a la producción de esa cantidad. Al verse aumentada su concentración hasta un 20% (un orden de magnitud mayor), estas enzimas podrían no tener una velocidad de funcionamiento suficiente como para permitir el crecimiento celular a la misma velocidad que las cepas parentales.

Lo que parece claro en algunos mutantes es que a pesar de poseer una pared celular más debilitada, su tolerancia al etanol no se ve afectada, dado que en la mayoría

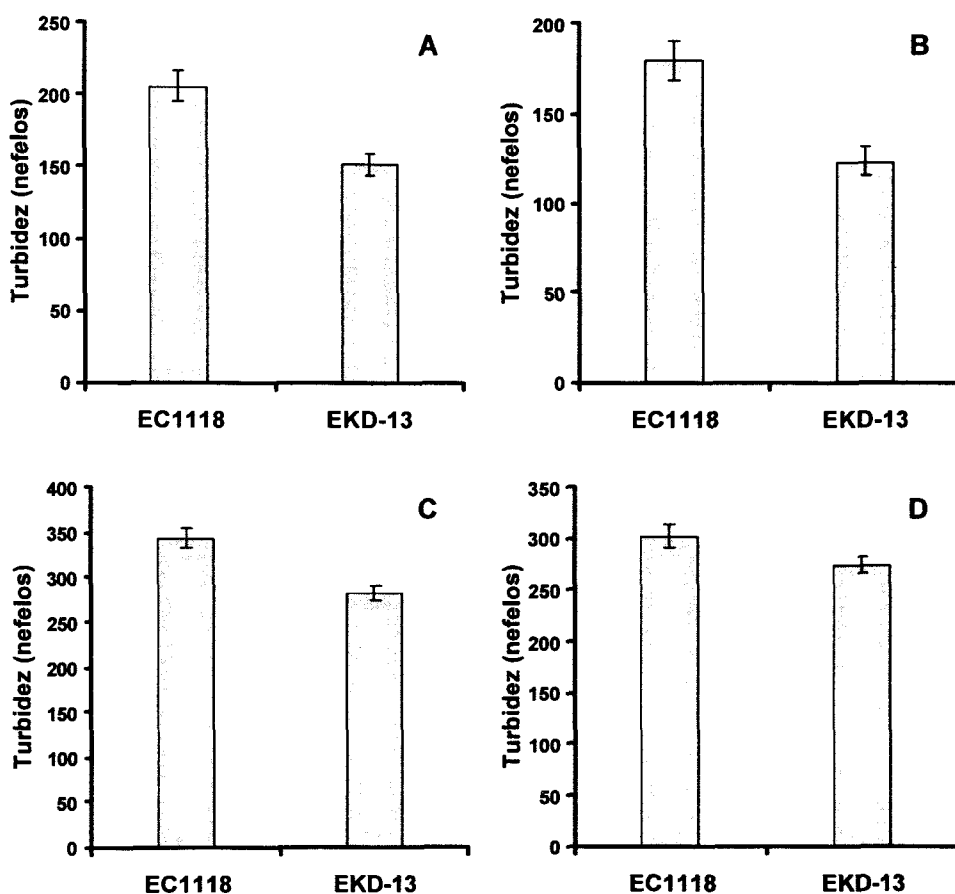
de los casos, han sido capaces de producir cantidades similares a las de las cepas parentales. Este dato, junto con la concentración de azúcares residuales similar a la de las cepas parentales, es un hecho importante a tener en cuenta, ya que a pesar de presentar velocidades de fermentación en algunos casos inferiores, su aplicabilidad industrial en vinificación no estaría aparentemente afectada.

### **3.5. Estabilidad proteica de los vinos naturales fermentados.**

Las manoproteínas son liberadas al vino por las levaduras durante la fermentación y crianza sobre lías. La concentración de manoproteínas en el vino es dependiente, entre otros factores, de la levadura con la que ha sido fermentado. Por lo tanto, es esperable una concentración de manoproteínas mayor en vinos fermentados con las levaduras que presentaron una mayor liberación de manoproteínas en condiciones de laboratorio. Además, estas diferencias de concentración pueden traducirse en diferencias en propiedades como la quiebra proteica, que está influida por la concentración de manoproteínas que contenga, es decir; un vino que haya sido fermentado por una levadura que ha liberado una mayor cantidad de manoproteínas se espera que sea más estable frente a quiebra proteica que otro fermentado por otra que libere menos. Teniendo esto en cuenta y considerando que con el aumento en la concentración de manoproteínas se pretende mejorar propiedades tecnológicas del vino, se determinó la estabilidad proteica de los vinos fermentados por las cepas delecionadas en los diferentes genes frente a sus respectivas cepas parentales. Cabe destacar que los vinos en los que se determinó la estabilidad proteica son los mismos elaborados en el apartado anterior.

#### **3.5.1. Cepas delecionadas en *KNR4*.**

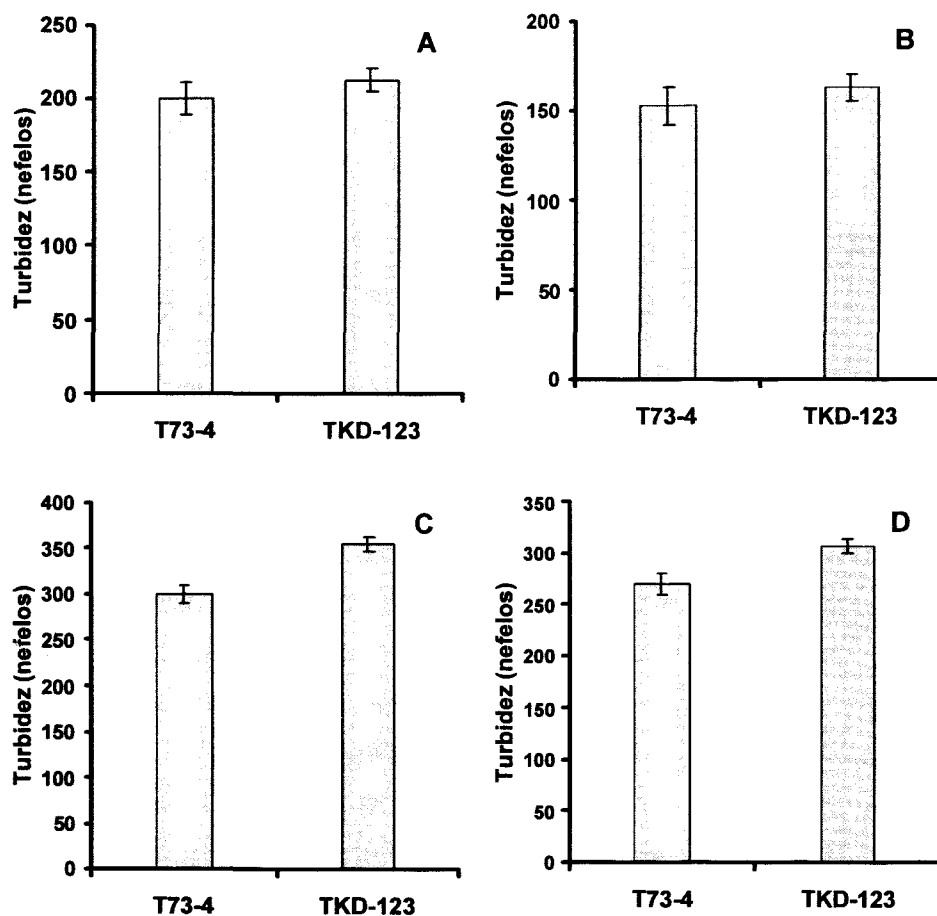
Los vinos fermentados por EKD-13 (que liberó 4 veces más polisacáridos en condiciones de laboratorio que su cepa parental) presentaron, salvo excepciones, una estabilidad proteica superior que los fermentados por EC1118 (figura 48). En todos los casos, la turbidez de estos vinos fue significativamente inferior a la presentada por los vinos de la cepa parental.



**Figura 48:** Turbidez de los vinos fermentados por EKD-13 y EC1118 en los que se indujo la quiebra proteica. A y B corresponden a los vinos de 2007 y C y D a los de 2006 cuyas cinéticas de fermentación se muestran en la figura 42.

La turbidez absoluta de los vinos fue inferior en las fermentaciones de mosto de 2007, siendo además en estos vinos en los que se aprecian mayores diferencias de turbidez entre ambas cepas. En estas fermentaciones, los vinos fermentados por EKD-13 presentaron valores de turbidez entre un 18,5% y un 31% menores a los de EC1118. En los vinos de 2006 sin embargo la reducción de la turbidez por parte de EKD-13 fue algo menor, entre un 5,6% y un 17,9%.

Los resultados obtenidos para la cepa TKD-123 fueron muy diferentes de los obtenidos para la cepa delecionada en *KNR4* en fondo genético de EC1118 (figura 49).



**Figura 49:** Turbidez de los vinos fermentados por TKD-123 y T73-4 en los que se indujo la quiebra proteica. A y B corresponden a los vinos de 2007 y C y D a los de 2006 cuyas cinéticas de fermentación se muestran en la figura 43.

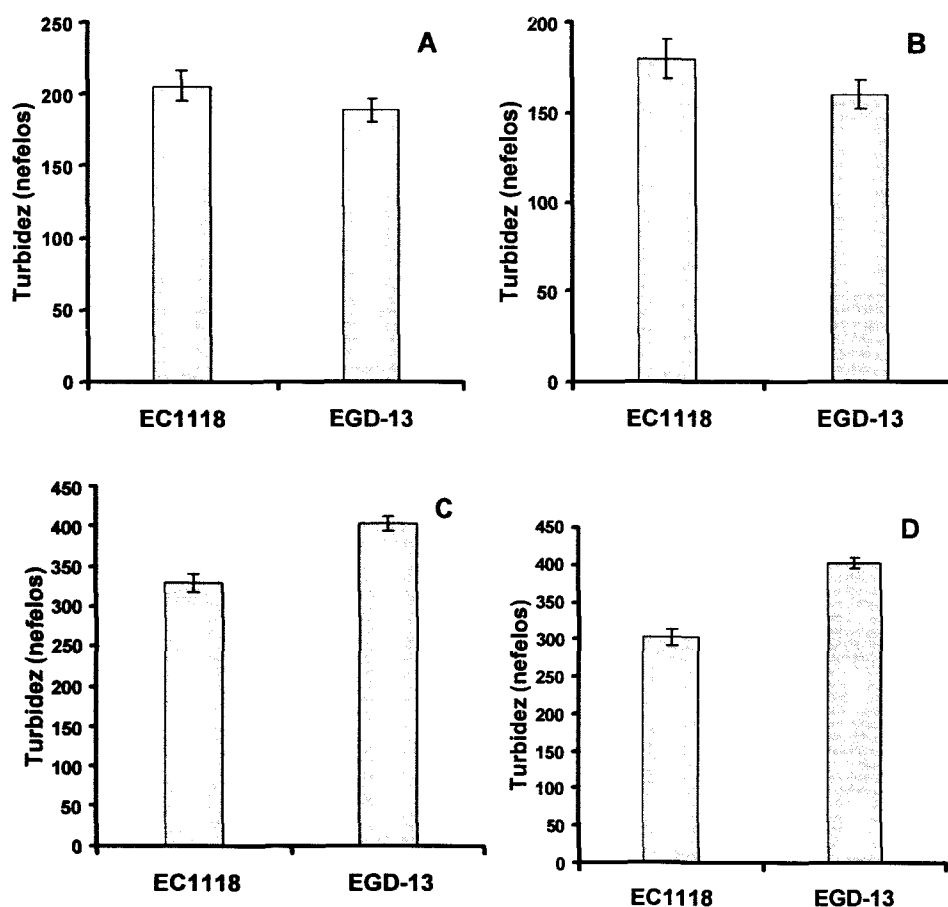
TKD-123 liberó en condiciones de laboratorio una concentración de polisacáridos 5 veces superior a la liberada por T73-4. Siendo esto así y habiéndose realizado la fermentación sin problemas, habría sido esperable una mayor liberación también durante la fermentación de mostos naturales, que se habría podido traducir en una mayor estabilidad proteica de los mismos. Sin embargo, en todos los vinos fermentados por TKD-123 se observó una turbidez significativamente superior a la de los procedentes de T73-4, resultado que contrasta con el obtenido para EKD-13. El hecho de que TKD-123 libere más polisacáridos durante el crecimiento en GCY y que los vinos fermentados por ella sean menos estables frente a quiebra proteica podría indicar dos cosas. La liberación de manoproteínas podría estar determinada por las condiciones de cultivo, de modo que TKD-123 liberara más durante el crecimiento en

GCY pero no durante la fermentación de un vino, lo que se traduciría en una estabilidad proteica menor. Este hecho afectaría también a T73-4 pero podría ser que su efecto fuera más severo en TKD-123 debido a los defectos en la estabilidad en la pared celular que la delección de *KNR4* conlleva. Por otro lado, podría darse el caso de que la liberación de manoproteínas por parte de TKD-123 fuera realmente superior a la de su cepa parental durante la fermentación de un vino, pero que a su vez liberara otros compuestos procedentes de la autólisis en mayor concentración que T73-4. Esta mayor concentración de este tipo de compuestos sería la responsable de la mayor turbidez del vino fermentado por TKD-123.

### 3.5.2. Cepas delecionadas en *GPI7*.

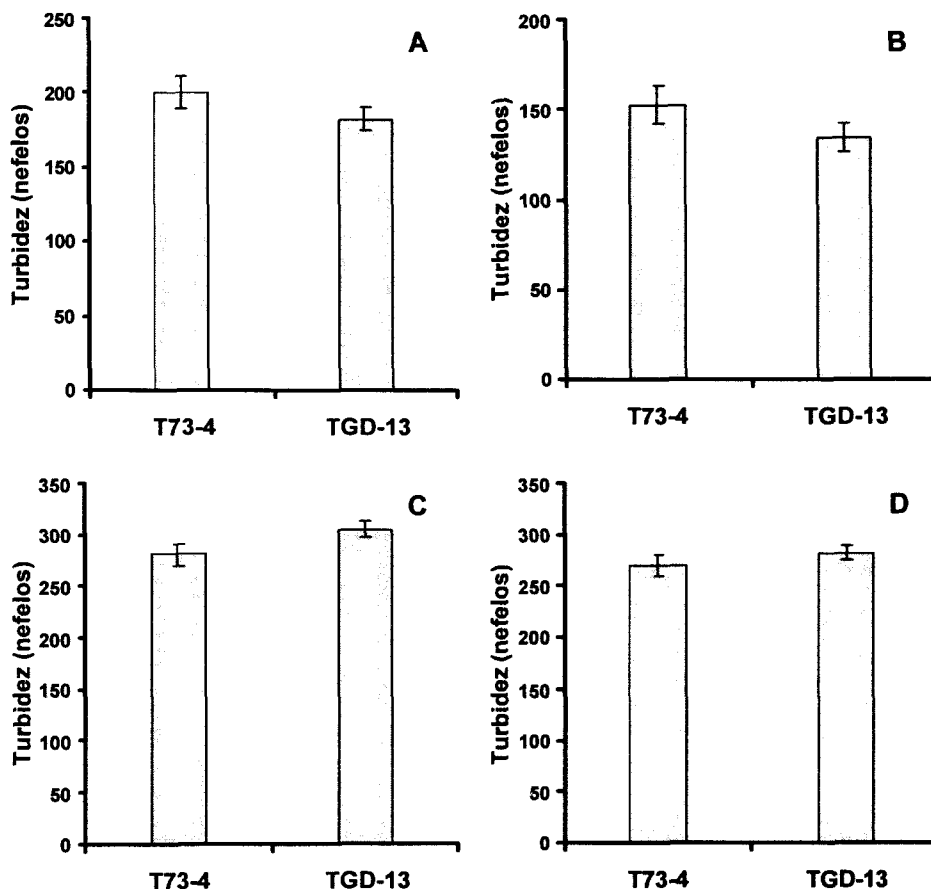
A tenor de lo observado para las cepas delecionadas en *GPI7* en los dos fondos genéticos estudiados, la liberación de manoproteínas parece ser dependiente de las condiciones de cultivo (figuras X y X). Los vinos de 2007 fermentados por EGD-13 son más estables que los de la cepa control, presentan valores de turbidez entre un 8% y un 17% menores (figura 50 A y B). Los vinos de 2006 fermentados por la misma cepa son sin embargo menos estables, presentando valores de turbidez entre un 22% y un 32% superiores a los de la cepa control (figura 50 C y D).

Esto podría indicar que no sólo el fondo genético sino las condiciones concretas de fermentación pueden influir sobre los fenotipos estudiados. Probablemente el enturbiamiento observado se debe a un equilibrio entre la composición original del mosto, los polisacáridos liberados por la levadura y otros materiales también liberados como consecuencia de la lisis celular. En el estudio de autólisis realizado con las cepas delecionadas en *GPI7* no se observó fenotipo autolítico para ninguna de ellas. Sin embargo, ese estudio se realizó en placas de YPD y podría ser que esas condiciones no fueran muy restrictivas y que el fenotipo autolítico no se expresara. La fermentación de un mosto con 33% de azúcar podría suponer una condición muy estresante para las células, de modo que se autolisaran con más facilidad que las cepas no modificadas.



**Figura 50:** Turbidez de los vinos fermentados por EGD-13 y EC1118 en los que se indujo la quiebra proteica. A y B corresponden a los vinos de 2007 y C a los de 2006 cuyas cinéticas de fermentación se muestran en la figura 44.

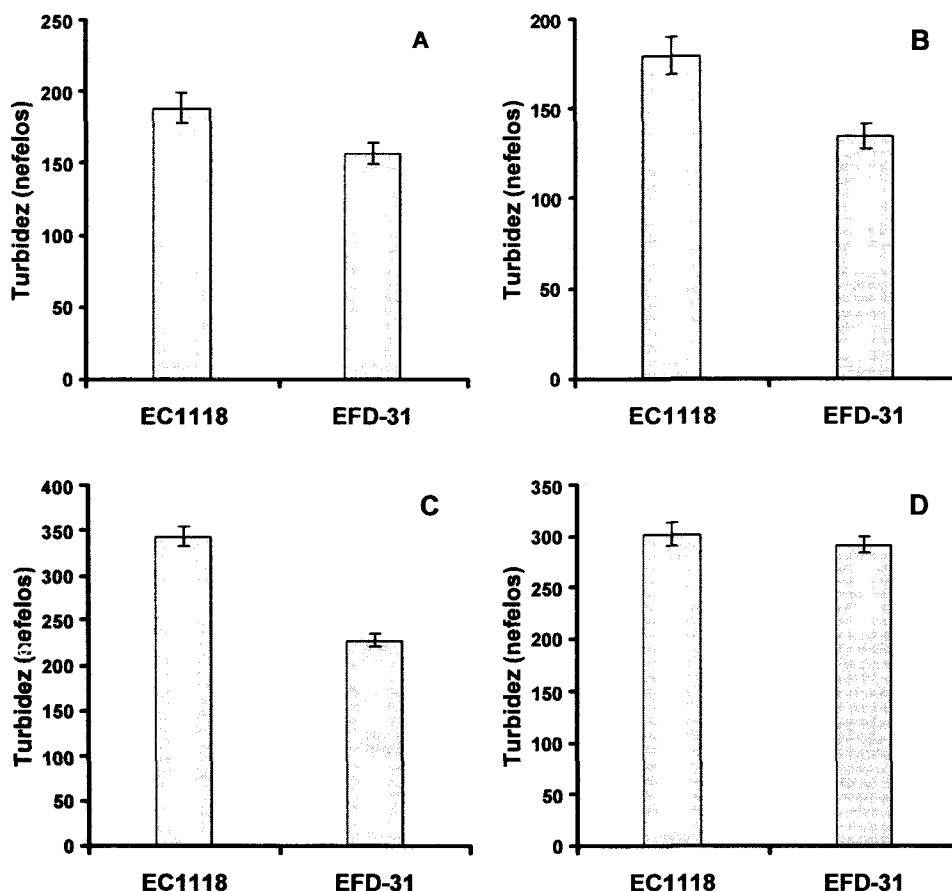
La cepa TGD-13 presenta un comportamiento similar al observado para EGD-13. El vino de 2007 fermentado por ella presenta valores de turbidez significativamente inferiores a los de su cepa parental, siendo esta diferencia de turbidez de entre un 5% y un 22% menor (figura 51 A y B). Los vinos de 2006 en cambio, o bien no presentan valores de turbidez significativamente diferentes entre la cepa delecionada y la control, o bien los valores presentados por TGD-13 son superiores (figura 51 C y D).



**Figura 51:** Turbidez de los vinos fermentados por TGD-13 y T73-4 en los que se indujo la quiebra proteica. A y B corresponden a los vinos de 2007 y C y D a los de 2006 cuyas cinéticas de fermentación se muestran en la figura 45.

### 3.5.3. Cepas deletionadas en *FKS1*.

EFD-31 claramente estabiliza más los vinos de 2007 que su cepa parental, siendo estos valores de turbidez de entre un 17% y un 25% menores (figura 52 A y B). En las fermentaciones de los vinos de 2006 se han observado diferencias entre un lote y otro (figura 52 C y D). En una primera fermentación se obtuvieron valores de turbidez significativamente inferiores a los de EC1118 (figura 52 C), siendo esta reducción además mayor que la observada para los vinos de 2007 (reducción de hasta el 33%). En una segunda fermentación en cambio, no se observaron diferencias significativas entre los vinos fermentados por la cepa deletionada y la parental (figura 52 D), indicando una variabilidad en el fenotipo de una fermentación a otra.

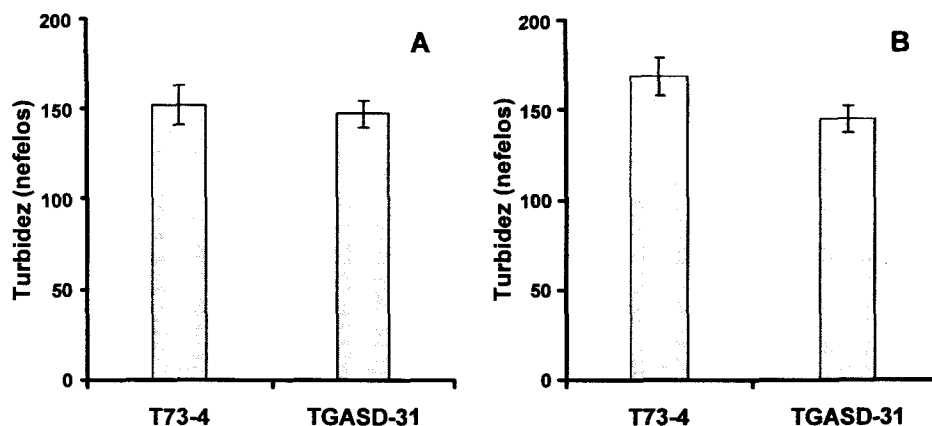


**Figura 52:** Turbidez de los vinos fermentados por EFD-31 y EC1118 en los que se indujo la quiebra proteica. A y B corresponden a los vinos de 2007 y C y D a los de 2006 cuyas cinéticas de fermentación se muestran en la figura 46.

#### 3.5.4. Cepas deletionadas en *GAS1*.

La cepa deletionada en *GAS1* solo fue capaz de llevar a término la fermentación en el caso de la realizada con mosto de 2007, de modo que solamente se disponen datos de estabilidad proteica de este único caso. Se realizaron dos réplicas de la fermentación y cada una de ellas arrojó un resultado diferente. En la primera de ellas (figura 53 A) no se observaron diferencias significativas entre las dos cepas. En la segunda fermentación en cambio (figura 53 B), la turbidez presentada por TGASD-31 fue un 14% menor que el vino de T73-4. Este resultado dispar indica al igual que para EFD-31 una variabilidad en la expresión del fenotipo de una fermentación a otra.





**Figura 53:** Turbidez de los vinos procedentes de mosto de 2007 fermentados por TGASD-13 y T73-4, en los que se indujo la quiebra proteica.

### 3.5.5. Discusión de los resultados.

El tipo de mosto con el que se han elaborado los diferentes vinos ha resultado ser un factor determinante en la estabilidad proteica de los vinos resultantes. En términos generales, los de 2007 presentaron valores de turbidez menores que los de 2006. Es decir, los vinos procedentes de mosto con una cantidad de azúcares mayor (el caso del 2006), presentaron valores de turbidez superiores a los de los vinos procedentes de mosto con menos azúcar. La mayor concentración de azúcares en el mosto de 2006 sería debida a una mayor maduración de las uvas respecto al mosto de 2007. En esa mayor maduración de las uvas también se habría visto aumentada la concentración de proteínas, factor muy determinante en la susceptibilidad del vino resultante de sufrir quiebra proteica (Tattersall, *et al.* 1997). Además, las proteínas presentes en la uva y susceptibles de precipitar y formar agregados son proteínas PR, proteínas de respuesta a la infección por patógenos y su síntesis es estimulada por éste hecho (Waters 1996). Por ello, el estado fitosanitario de las uvas con las que se elaboraron los mostos de 2006 (algo sin determinar) podría también haber influido en estas diferencias.

Las diferencias de turbidez entre los vinos fermentados por EC1118 y EKD-13 han sido mayores en el lote del 2007 que en el de 2006. En el caso de EFD-31, salvo un caso en una fermentación de mosto del 2006 en el que la diferencia de turbidez entre el mutante y el control fue máxima, en el resto de casos se apreciaron mayores diferencias con los vinos de 2007. Más aun, las cepas delecionadas en *GPI7* presentaron una estabilización

frente a las cepas parentales en vinos del 2007 mientras que en los del 2006 no solo no los estabilizaron, sino que la turbidez fue mayor que los controles. Esto muestra un claro efecto del tipo de mosto sobre la estabilización proteica de las cepas mutantes, factor importante a tener en cuenta respecto a su aplicabilidad industrial.

### **3.6. Determinación de la dosis mínima de bentonita necesaria para la estabilización de vinos naturales fermentados.**

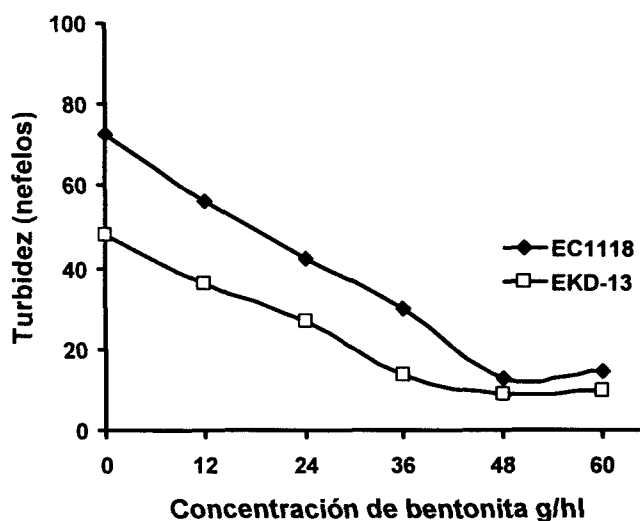
Los vinos fermentados por algunas de las cepas construidas, aunque presentaron valores de turbidez menores que los de la cepa control, no eran completamente estables, de modo que la utilización de estas cepas no resolvería completamente el problema de la quiebra proteica. Sin embargo, debido al efecto protector que las manoproteínas ejercen sobre la desestabilización proteica, los vinos fermentados por algunas de las cepas construidas, podrían requerir dosis de bentonita inferiores a las que requeriría su cepa parental. Para estudiar este hecho, se realizaron fermentaciones de 700 ó 500 ml de mosto *Sauvignon Blanc* de la cosecha del 2007 con las cepas delecionadas en todas las copias. A diferencia de las fermentaciones anteriores, éstas se elaboraron con mostos sin desfangar, asemejándose algo más al proceso de elaboración en bodega.

Los diferentes vinos fueron tratados con dosis de bentonita de 12, 24, 36, 48, y 60 g/hl tal y como se describe en materiales y métodos. Posteriormente se indujo la quiebra proteica y se midió la turbidez de los diferentes vinos tratados. Los vinos se consideraron estables cuando un aumento en la concentración de bentonita no se tradujo en una disminución de la turbidez.

#### **3.6.1. Cepas delecionadas en KNR4.**

##### **3.6.1.1. EKD-13.**

El vino sin tratar fermentado por EKD-13, presentó una turbidez casi un 35% inferior a la de EC1118 (figura 54). La turbidez de ambos vinos disminuyó de manera similar al aumentar la concentración de bentonita, sin embargo, el vino fermentado por EKD-13 alcanzó la estabilidad tras el tratamiento con 36 g/hl, mientras que fueron necesarios 48 g/hl para conseguir el mismo efecto en el vino fermentado por EC1118.



**Figura 54:** Estabilización por bentonita de los vinos fermentados por las cepas EC1118 y EKD-13.

La detección de las manoproteínas mediante Concanavalina A marcada con peroxidasa mostró algunas diferencias respecto a lo observado en la primera fase del estudio para las cepas de laboratorio. En las muestras de vinos se observan dos grupos de proteínas claramente diferenciadas, un grupo que consta de numerosas proteínas de mayor tamaño (entre aproximadamente 50 kDa hasta más de 200 kDa) y otro que consta de proteínas menos abundantes de menor tamaño (hasta aproximadamente 35 kDa) (figura 55).

**Mosto Vino**

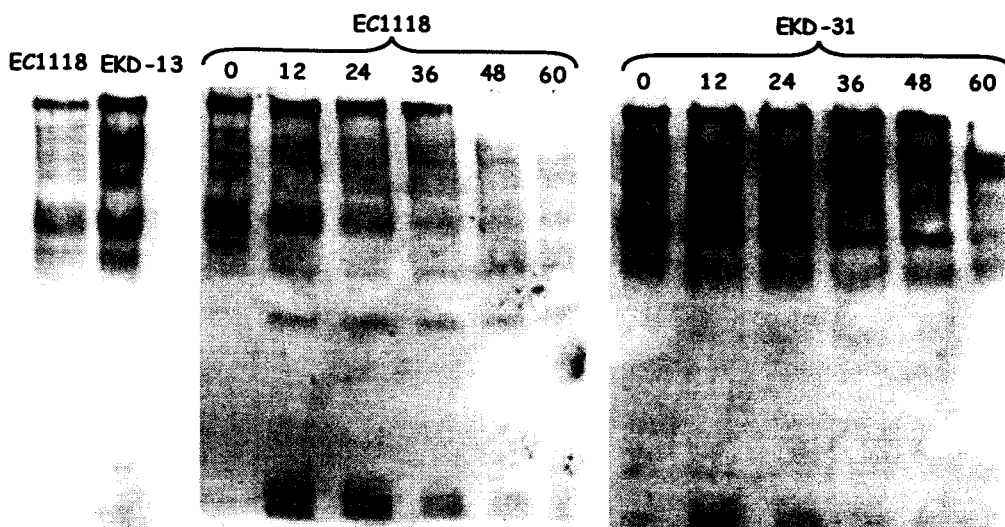


**Figura 55:** Detección con Concanavalina A marcada con peroxidasa de las proteínas presentes en el mosto y en un vino fermentado por EFD-31.

El primer grupo presenta un patrón muy similar al observado en los experimentos realizados en condiciones de laboratorio y corresponde en gran medida a las manoproteínas liberadas por las levaduras, ya que su presencia es detectable en el vino y no en el mosto. No obstante, algunas proteínas de ese grupo se observan también en el mosto, indicando su origen en la uva.

El segundo grupo de proteínas, de menor tamaño, no estaba presente en los experimentos realizados en condiciones de laboratorio. Podría tratarse de manoproteínas de la levadura, que se expresan durante la fermentación de un vino y no en condiciones de laboratorio. Por otro lado, a pesar de que su patrón no coincide con el de las proteínas de pequeño tamaño detectadas en el mosto, no es descartable que se trate de glicoproteínas de la uva, que se habrían degradado parcialmente durante la fermentación, generando el patrón de bandas observado en el vino. De hecho, considerando el tamaño de las bandas observadas en el vino, sería posible que entre ellas se encontraran las proteínas PR, responsables de la quiebra proteica. Estas proteínas contienen en su secuencia aminoacídica una elevada proporción de aminoácidos como la asparragina, serina y/o treonina (Waters *et al.* 1992) y estos aminoácidos son los puntos para la N- y la O-glicosilación (Dean 1999, Strahl-Bolsinger *et al.* 1999, Lesage *et al.* 2006) lo que indica que podrían estar altamente glicosiladas. Debido a esto, podrían encontrarse entre las bandas de pequeño tamaño detectadas mediante Concanavalina A, ya que ésta se une indistintamente polímeros de glucosa y manosa unidos mediante un enlace  $\alpha$ . No obstante, sería necesario un análisis específico para identificar las proteínas correspondientes a las bandas de pequeño tamaño observadas en el vino.

La concentración de manoproteínas presentes en los vinos fermentados por las diferentes cepas fue muy diferente, siendo la del vino fermentado por EKD-13 muy superior a la de su cepa parental (figura 56). Este dato demuestra que para la cepa EKD-13, el fenotipo de mayor liberación de manoproteínas no solo se expresa en condiciones de laboratorio, sino que también se produce durante la fermentación de un mosto natural. Al final de la fermentación, el vino fermentado por EKD-13 se encuentra más enriquecido en manoproteínas y esta mayor concentración estaría en el origen de su mayor estabilidad proteica.



**Figura 56:** Detección mediante Concanavalina A marcada con peroxidasa de las manoproteínas presentes en los vinos fermentados por EC1118 y EKD-13, y tratados con concentraciones crecientes de bentonita. La imagen de la izquierda corresponde a los vinos sin tratar y los números indican los g/hl de bentonita usados en el tratamiento de los vinos.

El tratamiento del vino fermentado por EC1118 con dosis crecientes de bentonita, supuso una reducción drástica de las manoproteínas presentes (figura 56). Además, la concentración de manoproteínas en los vinos estables (tratados con al menos 48 g/hl de bentonita), fue muy inferior a la del vino sin tratar. La reducción en la concentración de manoproteínas debido al uso de la bentonita, supone un inconveniente añadido los defectos ya comentados anteriormente. La bentonita no solo eliminaría compuestos importantes para las propiedades organolépticas del vino, sino que al reducir también la concentración de manoproteínas, las propiedades asociadas a su presencia, se verían también negativamente afectadas.

La reducción en la concentración de manoproteínas observada para el vino fermentado por EC1118 no se produjo de igual modo en el vino fermentado por EKD-13. Este vino se mostró estable tras el tratamiento con 36 g/hl de bentonita, y en el vino tratado, la concentración de manoproteínas presentes no se vio en gran medida reducida respecto al vino sin tratar. Es más, la concentración de manoproteínas presentes en el vino fermentado por EKD-13 y tratado con 36 g/hl de bentonita, fue incluso superior a la del vino sin tratar fermentado por EC1118. Por lo tanto, EKD-13 no solo daría un vino con menores requerimientos de bentonita para alcanzar la estabilidad proteica, sino que la concentración de manoproteínas presentes, estaría muy aumentada respecto a la

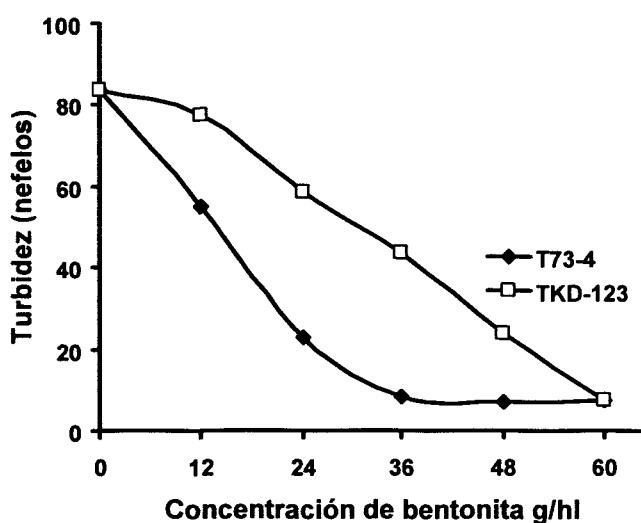
cepa parental, manteniéndose otras características positivas asociadas a su presencia de manoproteínas.

Un hecho que se observa en los vinos tratados, es una reducción de las proteínas de pequeño tamaño al aumentar la concentración de bentonita, siendo su presencia nula o solo ligeramente detectable en vinos estables. Este dato reforzaría la hipótesis de que entre ellas se encuentran las proteínas PR, ya que su eliminación del vino en una concentración suficiente, está en el origen de la estabilidad proteica.

### 3.6.1.2. TKD-123.

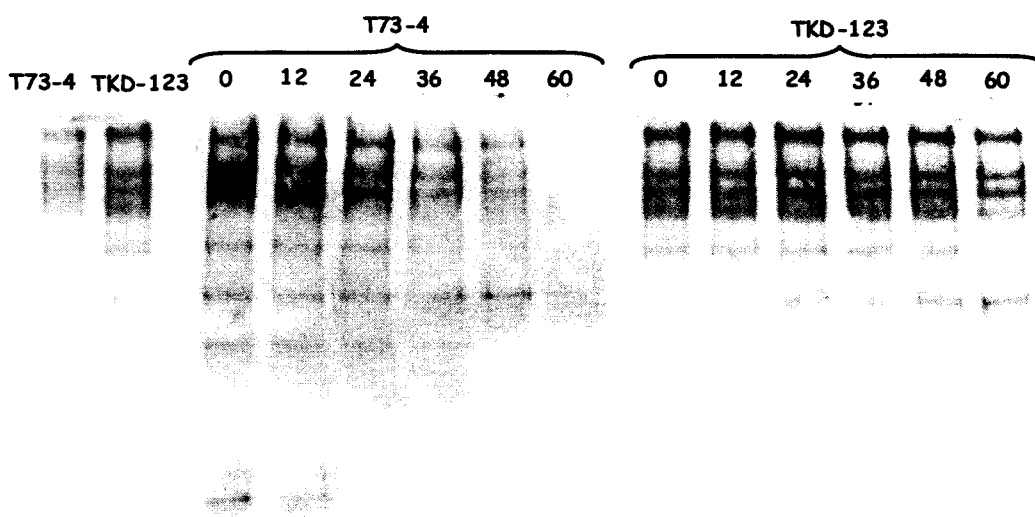
Los vinos fermentados por TKD-123 y anteriormente analizados, presentaron en todos los casos una turbidez superior a los de la cepa control. En este caso, la turbidez del vino fermentado por TKD-123 y por su cepa parental fue muy similar (figura 57), contrastando con los resultados obtenidos en experimentos anteriores, para la fermentación del mismo mosto. Esta diferencia podría deberse a la utilización en este último caso, de mosto sin desfanganar, en contraste con fermentaciones anteriores para las que se utilizó mosto desfanganado por centrifugación.

Los requerimientos de bentonita del vino de TKD-123 fueron muy superiores a los de T73-4, ya que no se mostró estable hasta ser tratado con 60 g/hl de bentonita, mientras que el de su cepa parental alcanzó la estabilidad con 36 g/hl.



**Figura 57:** Estabilización por bentonita de los vinos fermentados por las cepas T73-4 y TKD-123.

En los experimentos de quiebra proteica realizados anteriormente con TKD-123, se expuso la hipótesis de que la mayor turbidez de sus vinos, podía ser debida a una menor concentración de manoproteínas. Esto sería consecuencia de que el fenotipo de mayor liberación de manoproteínas se expresara en condiciones de laboratorio, pero no durante la fermentación de un mosto natural. Los resultados de la detección de manoproteínas demuestran que no es este el caso, ya que la concentración fue superior en el caso de TKD-123 que en el de T73-4 (figura 58). Este hecho parece contradecir lo expuesto hasta ahora, es decir, que una mayor concentración de manoproteínas da lugar a vinos más estables frente a quiebra proteica. Sin embargo, es importante destacar que otros factores diferentes de la concentración de manoproteínas, juegan un papel importante en el desarrollo de la quiebra proteica. Así, el resultado observado para TKD-123 podría deberse a una mayor liberación de algunos compuestos, como consecuencia de una mayor autólisis. Estos compuestos tendrían una influencia negativa sobre la quiebra proteica, haciendo que el vino presentara una turbidez superior, a pesar de estar más enriquecido en manoproteínas.



**Figura 58:** Detección mediante Concanavalina A marcada con peroxidasa de las manoproteínas presentes en los vinos fermentados por T73-4 y TKD-123 y tratados con diferentes dosis de bentonita. La imagen de la izquierda corresponde a los vinos sin tratar y los números indican los g/hl de bentonita usados en el tratamiento de los vinos.

La detección de las manoproteínas de los vinos tratados con bentonita, muestra una importante reducción de su concentración en el vino fermentado por T73-4. En el

caso de TKD-123 sin embargo, no sucede lo mismo ya que la concentración de manoproteínas apenas se ve afectada en relación con la concentración de bentonita.

En el vino fermentado por T73-4 y tratado con bentonita se observa cómo a partir de los 36 g/hl, la concentración a la que se alcanza la estabilidad, las proteínas de pequeño tamaño son indetectables (figura 58). En el vino de TKD-123 sin embargo, esta reducción no se produce de la misma manera, y su presencia se hace indetectable solamente tras tratar el vino con 60 g/hl de bentonita, coincidiendo con la concentración a la que el vino se vuelve estable. Esto hecho, por un lado, refuerza la hipótesis de que entre estas proteínas se encuentran las proteínas PR, ya que solamente se alcanza la estabilidad proteica al ser completamente eliminadas del vino. Por otro lado, indicaría que la mayor turbidez de los vinos de TKD-123, es debida a la liberación por parte de esta, de compuestos que afectan negativamente a la quiebra proteica, probablemente procedentes de su autólisis. Estos compuestos además, competirían con las proteínas PR por la bentonita, haciendo que su eliminación fuera menos eficiente, lo que se traduciría en el requerimiento de concentraciones superiores para su estabilización.

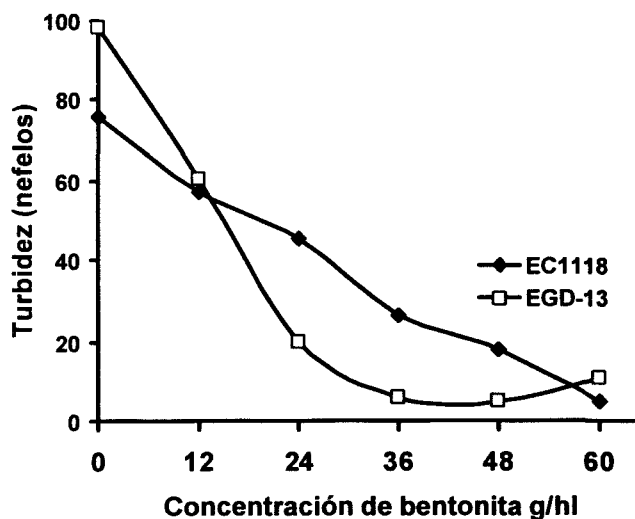
A tenor de estos resultados, la delección de *KNR4* en T73-4 no supone una ventaja en relación a la quiebra proteica, ya que a pesar de enriquecerse el vino en manoproteínas, la concentración de bentonita requerida para su estabilización es mayor, con el consiguiente efecto negativo sobre las características organolépticas del vino. Sin embargo, esto podría paliarse mediante un sistema más específico que la bentonita para la eliminación de las proteínas PR, como puede ser el uso de quitina (Vincenzi *et al.* 2005). Los vinos fermentados por TKD-123 y estabilizados con quitina, contendrían una mayor concentración de manoproteínas, pudiendo verse afectadas positivamente otras propiedades del vino diferentes de la quiebra proteica. Adicionalmente, la cepa TKD-123 podría ser aplicada a la fermentación de vinos en los que la quiebra proteica no fuera un problema, pero en los que un enriquecimiento en manoproteínas supusiera una ventaja en relación a sus propiedades organolépticas. Este podría ser el caso de los vinos tintos que verían mejoradas algunas características relacionadas con el color y los aromas, como consecuencia de la mayor liberación de manoproteínas.



### 3.6.2. Cepas delecionadas en GPI7.

#### 3.6.2.1. EGD-13.

El estudio de estabilización por bentonita realizado con el vino fermentado por EGD-13 mostró un resultado inesperado, ya que su turbidez fue superior a la mostrada por el vino fermentado por EC1118 (figura 59). Esto contrasta con lo observado previamente en los ensayos de quiebra proteica realizados con vinos del 2007, en los que la turbidez de los vinos fermentados por EGD-13 fue en todos los casos inferior a la de EC1118. Es importante destacar que las primeras fermentaciones se realizaron con mostos desfangados mientras que para ésta última se utilizó mosto sin desfangar. Este hecho podría estar en el origen de las diferencias observadas en los diferentes vinos.

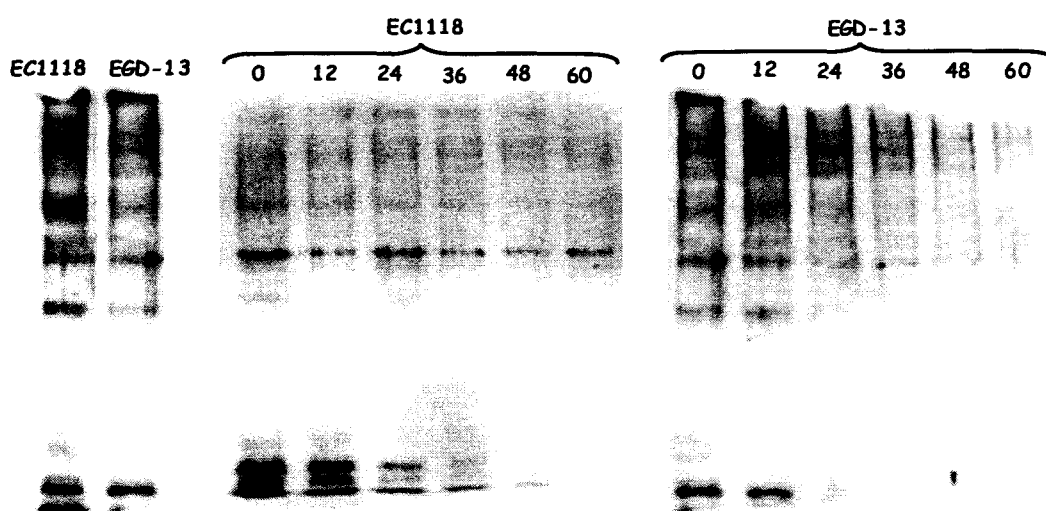


**Figura 59:** Estabilización por bentonita de los vinos fermentados por las cepas EC1118 y EGD-13.

Un hecho sorprendente es que el vino fermentado por EGD-13, a pesar de mostrar una turbidez inicial superior a la de EC1118, alcanzó la estabilidad tras el tratamiento con una concentración inferior de bentonita (figura 59). La reducción de la turbidez al aumentar la concentración de bentonita fue mucho más acusada en el vino de EGD-13, alcanzándose la estabilidad al tratarlo con 36 g/hl, mientras que en el de EC1118 la estabilidad no se alcanzó hasta los 60 g/hl. En réplicas independientes de este ensayo, el resultado obtenido fue el mismo: el vino fermentado por EGD-13

presentó una turbidez inicial superior, pero alcanzó la estabilidad a concentraciones menores de bentonita que el de la cepa control (no se muestran los datos).

La detección de las manoproteínas presentes en los vinos de las dos cepas, mostró una concentración ligeramente superior para EC1118 respecto a la cepa mutante (figura 60). Esta diferencia de concentración explicaría la menor turbidez del vino fermentado por ella.

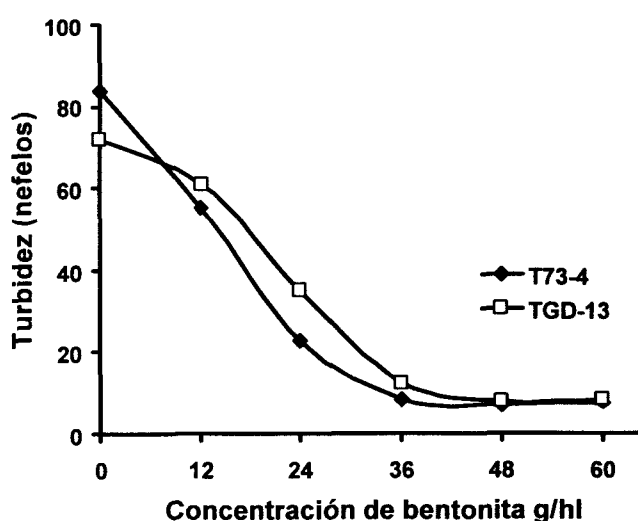


**Figura 60:** Detección mediante Concanavalina A marcada con peroxidasa de las manoproteínas presentes en los vinos fermentados por EC1118 y EGD-13, y tratados con concentraciones crecientes de bentonita. La imagen de la izquierda corresponde a los vinos sin tratar y los números indican los g/hl de bentonita usados en el tratamiento de los vinos.

En el vino fermentado por EGD-13 y tratado con bentonita, se observa una rápida reducción de la concentración de manoproteínas, mientras que en el vino fermentado por EC1118 la reducción es menos drástica. De manera contraria a lo observado para TKD-123, este dato también contradiría lo expuesto hasta ahora, ya que habiendo liberado EGD-13 menos manoproteínas que EC1118, el vino fermentado por ella presenta menores requerimientos de bentonita para ser estable. No obstante, es importante considerar que las diferentes manoproteínas presentan propiedades diferentes en el vino. Por ello, aun sin verse aumentada en los vinos fermentados por EGD-13 la concentración de manoproteínas totales, aquellas con mayor capacidad protectora frente a quiebra proteica podrían haber visto aumentada su proporción. Para determinar este hecho, sería necesaria una caracterización de las manoproteínas liberadas por ambas cepas.

## 3.6.2.2. TGD-13.

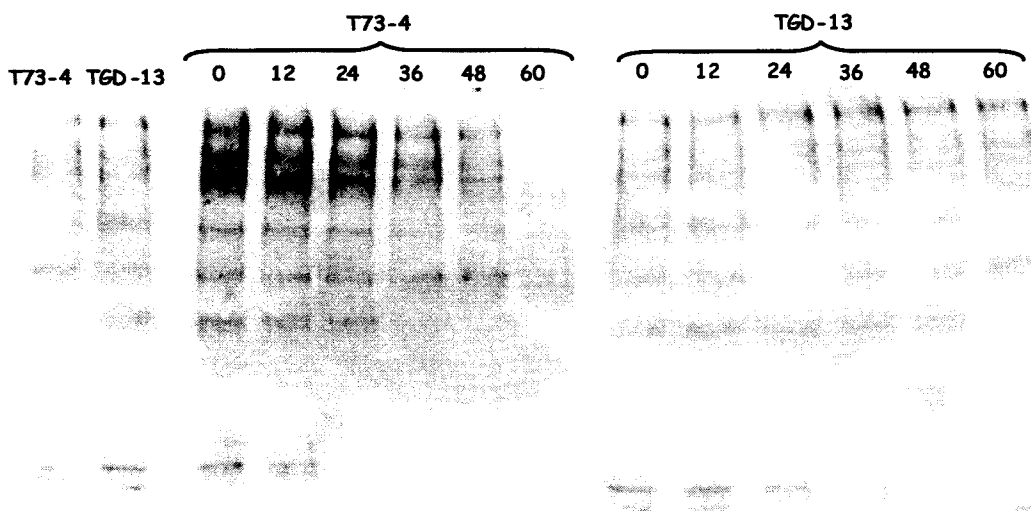
La turbidez de partida del vino fermentado por TGD-13 fue inferior a la del fermentado por su cepa parental (figura 61). La detección de manoproteínas reveló una concentración superior para la cepa TGD-13 (figura 62), lo que estaría en el origen de una turbidez menor. Esta mayor concentración de manoproteínas sin embargo, no se tradujo en un menor requerimiento de bentonita para su estabilización, ya que para ello fueron necesarios 48 g/hl mientras que T73-4 necesitó solamente 36 g/hl.



**Figura 61:** Estabilización por bentonita de los vinos fermentados por las cepas T73-4 y TGD-13.

En la detección de las manoproteínas en los vinos tratados (figura 62), se observa que en el vino de T73-4, las proteínas de bajo peso molecular se hacen indetectables tras el tratamiento con 36 g/hl de bentonita. En el caso de TGD-13 sin embargo, esto no sucede hasta alcanzarse los 48 g/hl, coincidiendo respectivamente con las concentraciones a la que los vinos se hacen estables. Esto indicaría, que las proteínas presentes en el vino de TGD-13 y susceptibles de generar quiebra proteica, serían unidas a la bentonita menos eficientemente que en el caso de su cepa parental. De igual modo que lo observado para TKD-123, esta disminución en la eficiencia de unión podría ser debida a la competencia de las proteínas PR con otros compuestos autolíticos liberados por TGD-13. De hecho, TGD-13 se mostró más autolítica que T73-4 en los ensayos de autólisis realizados en placas de YPD+BCIP (figura 39). Este hecho, explicaría además el resultado diferente obtenido en los ensayos de

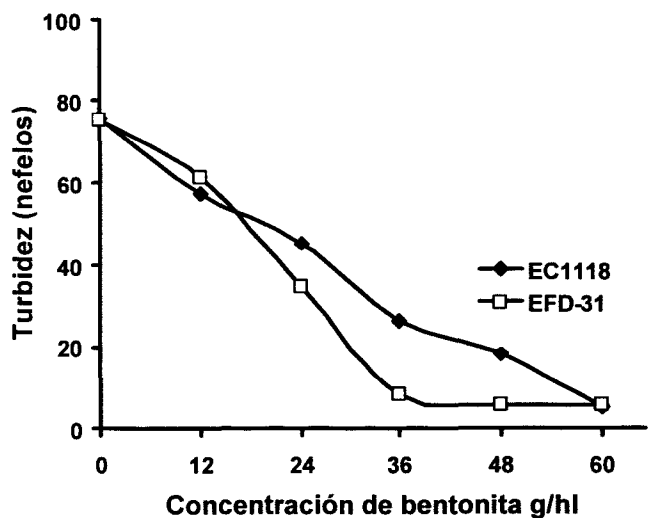
estabilización por bentonita, para las dos cepas delecionadas en *GPI7*. La cepa EGD-13, que no mostró un fenotipo autolítico, produjo vinos con menores requerimientos de bentonita que su cepa parental, mientras que TGD-13, más autolítica que T73-4, presentó requerimientos mayores.



**Figura 62:** Detección mediante Concanavalina A marcada con peroxidasa de las manoproteínas presentes en los vinos fermentados por T73-4 y TGD-13 y tratados con diferentes dosis de bentonita. La imagen de la izquierda corresponde a los vinos sin tratar y los números indican los g/hl de bentonita usados en el tratamiento de los vinos.

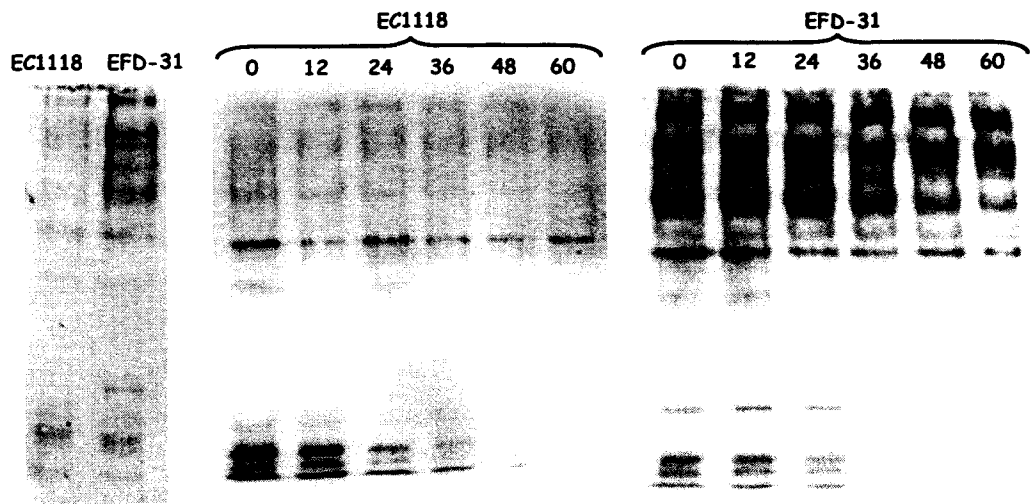
### 3.6.3. Cepas delecionadas en *FKS1*: EFD-31.

A diferencia de lo observado en experimentos anteriores, en los que los vinos fermentados por EFD-31 presentaron una turbidez menor que la cepa control, en esta última fermentación, la turbidez fue similar a la registrada por EC1118 (figura 63). Al igual que lo ocurrido con EGD-13, el haber utilizado mosto sin desfanganar para esta fermentación podría ser la causa de esta diferencia. La disminución de la turbidez al aumentar la concentración con bentonita sin embargo, fue más pronunciada en el vino fermentado por EFD-31 que en el de la cepa control. La concentración necesaria para la estabilización fue de 36 g/hl en el caso de la mutante, mientras que la cepa control alcanzó la estabilización tras el tratamiento con 60 g/hl. En experimentos previos realizados se observó una tendencia similar, habiendo mostrado los vinos fermentados por ambas cepas una turbidez inicial similar, el fermentado por EFD-31 alcanzó la estabilidad a menores concentraciones de bentonita (no se muestran los datos).



**Figura 63:** Estabilización por bentonita de los vinos fermentados por las cepas EC1118 y EFD-31.

La detección de las manoproteínas con Concanavalina A marcada con peroxidasa reveló una mayor concentración de manoproteínas en el vino fermentado por EFD-31 (figura 64).



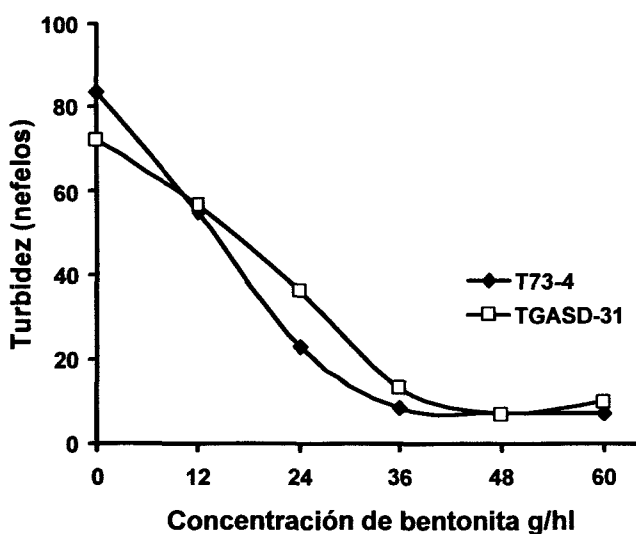
**Figura 64:** Detección mediante Concanavalina A marcada con peroxidasa de las manoproteínas presentes en los vinos fermentados por EC1118 y EFD-31, y tratados con concentraciones crecientes de bentonita. La imagen de la izquierda corresponde a los vinos sin tratar y los números indican los g/hl de bentonita usados en el tratamiento de los vinos.

En los vinos tratados, se observa que la concentración de manoproteínas no se ve en gran medida disminuida al aumentar la concentración de bentonita. Al igual que

lo observado para la cepa EKD-13, el vino fermentado por EFD-31 no solo estaría enriquecido en manoproteínas traduciéndose en menores requerimientos de bentonita para su estabilidad proteica, sino que la concentración de manoproteínas en los vinos estables sería aun elevada.

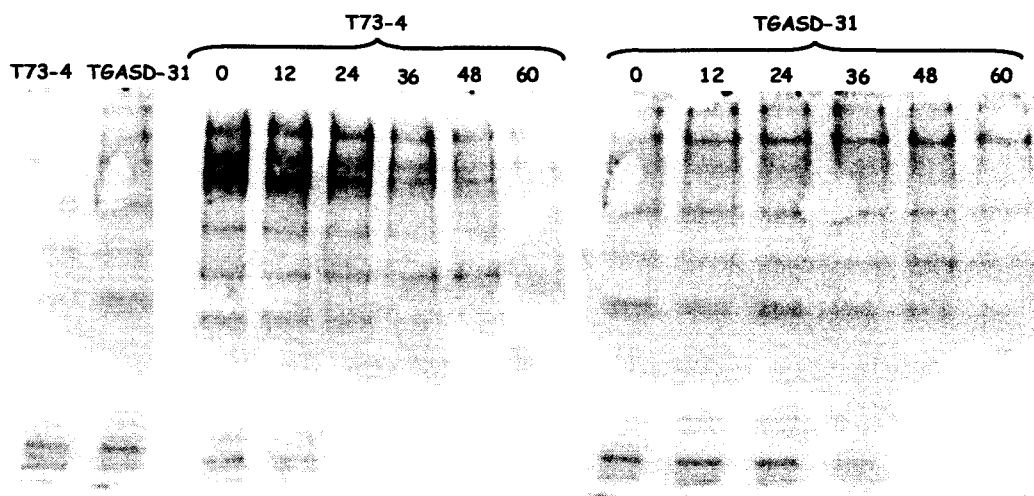
#### 3.6.4. Cepas delecionadas en *GAS1*: TGASD-31.

Los resultados obtenidos para la cepa TGASD-31 fueron muy similares a lo observado para TGD-31. La turbidez inicial fue inferior a la registrada por el vino de la cepa control (figura 65), probablemente a consecuencia de la mayor concentración de manoproteínas presentes (figura 66). No obstante, el requerimiento de bentonita para alcanzar la estabilidad fue superior en el caso de TGASD-31, ya que fueron necesarios 48 g/hl frente a los 36 g/hl de la cepa control.



**Figura 65:** Estabilización por bentonita de los vinos fermentados por las cepas T73-4 y TGASD-31.

El mayor requerimiento en bentonita para estabilizar el vino fermentado por TGASD-31, sería debido a la unión menos eficiente de las proteínas PR, de igual modo que lo observado para TKD-123 y TGD-13.



**Figura 66:** Detección mediante Concanavalina A marcada con peroxidasa de las manoproteínas presentes en los vinos fermentados por T73-4 y TGD-13 y tratados con diferentes dosis de bentonita. La imagen de la izquierda corresponde a los vinos sin tratar y los números indican los g/hl de bentonita usados en el tratamiento de los vinos.

#### 4. DISCUSIÓN GENERAL.

El presente trabajo constituye la primera descripción de cepas vínicas recombinantes de *S. cerevisiae* modificadas para una mayor secreción de manoproteínas. Algunas de estas cepas además, son capaces de fermentar un vino y reducir su susceptibilidad de sufrir quiebra proteica. El abordaje ha sido diferente del utilizado por otros grupos para la construcción de otras cepas vínicas recombinantes de *S. cerevisiae*. En la mayoría de los casos las modificaciones han consistido en la introducción de un gen que, expresado en la levadura, da lugar a un fenotipo de interés. Esto ha implicado generalmente el trabajo con un único gen diana que ha sufrido pocas modificaciones, y que expresado en la levadura, genera un bajo impacto en las células. En nuestro caso, tras un *screening* previo entre 9 genes potencialmente interesantes, la construcción de las cepas vínicas recombinantes se ha realizado hasta con 4 genes diana. Además, las modificaciones no han consistido en introducirlos en la levadura sino en eliminarlos. El fondo genético en el que se encuentran delecionados los diferentes genes, ha resultado ser un factor determinante en la expresión del fenotipo de mayor liberación de manoproteínas, de modo que se ha hecho necesaria la modificación de dos cepas vínicas diferentes. Unido a esto, el fenotipo también es recesivo, lo que ha implicado la eliminación de todas las copias activas de cada gen, que como en el caso de *KNR4* en fondo T73-4, ha consistido

en la eliminación de hasta tres copias del mismo. En resumen, se han construido 16 cepas delecionadas en 4 genes, en dos fondos genéticos diferentes y 6 de ellas presentaban uno de los cuatro genes estudiados, delecionados en todas las copias.

Los genes eliminados, están implicados en la síntesis de una estructura tan relevante para las células como la pared celular, y por lo tanto, son importantes en el metabolismo de *S. cerevisiae*. De este modo, y a diferencia de otras estrategias basadas en la expresión de genes, la deleción de genes tan importantes, aun no siendo letal, genera un gran impacto sobre las células. De hecho, las 6 cepas delecionadas en todas las copias muestran un crecimiento más lento que sus respectivas cepas parentales y en algunos casos, la fermentación del vino también puede verse ralentizada. Este crecimiento más lento podría ser debido a una fragilidad de las células, o también a que la construcción de una pared celular con una alterada, sea un proceso más lento que la síntesis de la pared normal. El crecimiento más lento sin embargo, no parece impedir la correcta fermentación de los vinos, ya que la concentración de azúcares residuales, en la mayoría de los casos, es similar a la de las cepas parentales. Solamente en algunas fermentaciones realizadas, con mosto que contenía una muy elevada concentración de azúcares (33 %(p/v)), se ha observado una concentración mayor de los azúcares residuales. Asimismo, las elevadas concentraciones de etanol producidas durante la fermentación tampoco parecen afectar a las cepas delecionadas de un modo diferente a como lo hacen sobre los controles. Teniendo en cuenta estos datos, potencialmente no habría impedimento para que estas cepas fueran aplicadas con éxito a procesos de fermentación a escala industrial, exceptuando los mostos con una elevada concentración de azúcares. En cualquier caso, para su aplicación industrial, la menor velocidad de fermentación de alguna de las cepas, sería un factor importante a tener en cuenta.

Anteriormente a este trabajo, otros grupos han abordado la mejora de la quiebra proteica del vino mediante la modificación genética de las levaduras. Brown *et al.* (2007) construyeron cepas de laboratorio que sobreexpresaban Hpf2p, una manoproteína con propiedades de reducción de la quiebra proteica. La proteína purificada, al ser añadida a un vino, fue capaz de reducir su turbidez hasta el 40% respecto al vino no tratado. Siendo esto así, su expresión en cepas vínicas sería interesante, ya que al final de la fermentación el vino podría estar enriquecido en Hpf2p y mostrar una mayor estabilidad proteica. De hecho, este podría ser el caso de algunas de las cepas construidas. La



delección de los genes *KNR4*, *FKS1* y *GAS1* da lugar al aumento de quitina y a la disminución de  $\beta$ -1,3-glucano de la pared, así como a la mayor expresión de algunas manoproteínas estructurales (Hong *et al.* 1994b, Popolo *et al.* 1997, Ram *et al.* 1998, García-Rodríguez *et al.* 2000, Terashima *et al.* 2000, Dijkgraaf *et al.* 2002, Lagorce *et al.* 2003). Entre estos genes se encuentran *CWP1*, *YLR194c* y *PST1*, y éste último corresponde al gen que codifica Hpf2p (Brown *et al.* 2007). Es muy probable que, al igual que lo observado por otros autores en cepas de laboratorio, las cepas vínicas delecionadas en *KNR4*, *FKS1* y *GAS1* tuvieran aumentada la expresión de Hpf2p. No obstante, este hecho debe aun ser probado para las cepas construidas, y especialmente durante la fermentación de un mosto natural, dado que las condiciones de cultivo pueden ser determinantes en la composición de la pared celular. Por ello, la mayor liberación de Hpf2p de las cepas construidas delecionadas en *KNR4*, *FKS1* y *GAS1*, podría estar en el origen de la mayor estabilidad proteica de los vinos fermentados por ellas. Asimismo, el uso de estas cepas podría suponer una ventaja frente a una que sobreexpresara Hpf2p, ya que mediante la delección de los genes no se produce la expresión de una única proteína, sino que son varias las que se sobreexpresan. Por ello, el aumento en la concentración de varias manoproteínas podría potenciar el efecto protector de Hpf2p, ya que algunas de las manoproteínas cuya concentración se viera aumentada, podrían tener también propiedades protectoras. Adicionalmente, es importante destacar que todas las manoproteínas no tienen el mismo efecto sobre las diferentes propiedades del vino. De este modo, proteínas que lo estabilizan frente a quiebra proteica, como la invertasa, pueden no dar un mejor resultado frente a quiebra tartárica (datos no mostrados). Por lo tanto, las cepas construidas serían potencialmente aplicables con diferentes propósitos, ya que además de aumentar la expresión de manoproteínas que protegen frente a quiebra proteica, podrían aumentar la de otras que estabilicen el color en tintos, reduzcan la astringencia etc. Estas consideraciones dejan abierto el camino para futuras investigaciones con estas cepas.

En la caracterización de las cepas vínicas construidas, se ha realizado la cuantificación de los polisacáridos totales liberados en condiciones de laboratorio, y todas ellas han presentado una concentración superior al de sus respectivas cepas parentales. Este sistema no discrimina entre los diferentes polisacáridos, de modo que la composición polisacarídica del material liberado, es un hecho que aun debe ser estudiado. No obstante, las cepas delecionadas en *KNR4*, *FKS1* y *GAS1*, tienen niveles de quitina en la

pared que pueden llegar hasta el 20% del peso seco de la misma, 10 veces más que en condiciones normales. Por lo tanto, los vinos fermentados por ellas además de en manoproteínas, podrían estar enriquecidos en quitina. Este aumento de la concentración de quitina en el vino, en el caso de producirse a niveles suficiente podría tener un impacto positivo sobre la quiebra proteica. Al aumentar la concentración de quitina, aumentaría su probabilidad de unión a la quitinasa de tipo IV, responsable junto con las proteínas TL de producir quiebra proteica. De este modo, podría ser eliminada del vino, o evitar su unión a otros compuestos implicados en la generación de quiebra proteica (Vincenzi *et al.* 2005).

Para la delección de *GPI7* se ha descrito un aumento en quitina de la pared (Richard *et al.* 2002), un mecanismo general de fortalecimiento de la pared, sin embargo, la sobreexpresión de *CWPI*, *YLR194c* y *PST1*, no ha sido descrita. No obstante, no es posible descartar que el menor requerimiento de bentonita observado para los vinos fermentados por EGD-13, se deba a la presencia de Hpf2p (codificada por *PST1*), ya que algunas manoproteínas típicas de la pared, son liberadas al medio como consecuencia de un anclaje defectivo (Richard *et al.* 2002), entre las que podría encontrarse Hpf2p. Es importante destacar que la delección de *GPI7* tiene efecto sobre proteínas con anclaje GPI, implicadas en la síntesis de la pared celular. Este es el caso de Gas1p, que ve muy ralentizado su transporte a través del retículo endoplasmático y el Golgi (Pittet *et al.* 2007). De este modo, el efecto que la delección de *GPI7* tiene sobre la estructura de la pared, podría deberse parcialmente al efecto indirecto de la actividad de otras proteínas.

Es importante tener en cuenta, que además de las propiedades positivas en vinificación, demostradas para algunas de las cepas construidas, hay aspectos que podrían limitar su uso industrial. En primer lugar, todas ellas contienen en el gen *kanMX4*, que confiere resistencia a un antibiótico. Por ello, sería necesario deleccionar nuevamente aquellos genes que resultaran más interesantes, para dar lugar a cepas GRAS, y por lo tanto, aptas para el consumo. En este aspecto, la elección del fondo genético sobre el que realizar las delecciones es un factor fundamental, ya que tal y como sucede para la delección de *KNR4*, en un fondo genético se consiguen vinos más estables mientras que en el otro no.

Unido a esto, todas las cepas construidas tienen una composición de la pared celular alterada, haciéndolas más vulnerables a condiciones de estrés y otros factores externos. Este hecho, podría hacer que su viabilidad se viera muy reducida en el proceso de producción de levadura seca activa, ya que la fase de secado por ejemplo, implica condiciones muy restrictivas para las células.

## **CONCLUSIONES**

La delección de los genes *FKSI*, *KNR4*, *GAS1* y *GPI7*, da lugar a una mayor liberación de polisacáridos y manoproteínas al medio.

El fenotipo asociado a la delección de los cuatro genes es recesivo, expresándose solamente en ausencia de copia activa de los mismos.

El fondo genético puede influir en la expresión del fenotipo de liberación de manoproteínas como consecuencia de la delección de los genes.

Las cepas EKD-13 y EFD-31 dan lugar a vinos enriquecidos en manoproteínas al final de la fermentación, que presentan una mayor estabilidad proteica..

Los vinos fermentados por las cepas EKD-13, EFD-31 y EGD-13, tienen menores requerimientos de bentonita para ser estabilizados frente a quiebra proteica.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Abramova, N.; Sertil, O.; Mehta, S.; Lowry, C.V. 2001. "Reciprocal regulation of anaerobic and aerobic cell wall mannoprotein gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*" *J. Bacteriol.* 183:2881-2887.
- Aguilar-Uscanga, B.; François, J.M. 2003. "A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation" *Lett. Appl. Microbiol.* 37:268-274.
- Alex, T.; Amado, R.; Bill, R.; Oettli, M. 1997. "Clarification with bentonite and metal release into wine" *Weinbau.* 133:395-397.
- Anon 2005. Commission Regulation (EC) no 123/2005 of 26 January 2005 amending Regulation (EC) no 466/2001 as regards ochratoxin A. Off. J. Eur. Union L 25: 3 –5.
- Barre, P.; Blondin, B.; Dequin, S.; Feuillat, M.; Sablayrolles, J.M.; Salmon, J.M. 2000. "La levadura de fermentación alcohólica" En: "Enología: fundamentos científicos y tecnológicos". 274-322. Claude Flanzky. Ed: Ediciones A. Madrid Vidente y Ediciones Mundi-Prensa. Madrid
- Basmaji, F.; Martin-Yken, H.; Durand, F.; Dagkessamanskaia, A.; Pichereaux, C.; Rossignol, M.; François, J. 2006. "The Interactome of the Knr4/Smil, a protein implicated in coordinating cell wall with bud emergence in *Saccharomyces cerevisiae*". *Mol. Gen. Genomics.* 275:217-230.
- Bauer, R.; Volschenk, H.; Dicks, L. M. 2005. "Cloning and expression of the malolactic gene of *Pediococcus damnosus* NCFB1832 in *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Biotechnol.* 118:353-362.
- Beggs, J. D. 1978. "Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid". *Nature.* 275:104-109.
- Bellachioma, A. 2002. "Mannoferm(R): a new method for management of polyphenols in winemaking". *Enologo* 38:89-93.
- Benachour, A.; Sipos, G.; Flury, I.; Reggiori, F.; Canivenc-Gansel, E.; Voinnet, C.; Conzelmann, A.; Benghezal, M. 1999. "Deletion of GPI7, a yeast gene required for addition of a side chain to the glycosylphosphatidylinositol (GPI) core structure, affects GPI protein transport, remodeling, and cell wall integrity" *J. Biol. Chem.* 274:15251-15261.
- Bendoni, B.; Cavalieri, D.; Casalone, E.; Polsinelli, M.; Barberio, C. 1999. "Trifluoroleucine resistance as a dominant molecular marker in transformation of

- p>strains of
- Saccharomyces cerevisiae*
- isolated from wine".
- FEMS Microbiol. Lett.*
- 180:229-233.
- Bisson, L. F. 2004. "The biotechnology of wine yeast". *Food Biotechnol.* 18:63-96.
  - Bony, M.; Bidart, F.; Camarasa, C.; Ansanay, V.; Dulau, L.; Barre, P.; Dequin, S. 1997. "Metabolic analysis of *S. cerevisiae* strains engineered for malolactic fermentation". *FEBS Lett.* 410:452-456.
  - Boone, C.; Sommer, S.S.; Hensel, A.; Bussey, H. 1990. "Yeast KRE genes provide evidence for a pathway of cell wall beta-glucan assembly" *J. Cell Biol.* 110:1833-1843.
  - Boorsma, A.; Nobel, H.; Riet, B.; Bargmann, B.; Brul, S.; Hellingwerf, K. J.; Klis, F. M. 2004. "Characterization of the transcriptional response to cell wall stress in *Saccharomyces cerevisiae*". *Yeast* 21:413-427.
  - Boulton, R. 2001. "The copigmentation of anthocyanins and its role in the colour of red wine: a critical review". *Am. J. Enol. Vitic.* 52:67-87.
  - Bowyer, P.K.; Moine-Ledoux, V. 2007. "Bentonite - it's more than just dirt" *Aust. Grapegrower Winemaker.* Feb:62-68.
  - Brown, S.L.; Stockdale, V.J.; Pettolino, F.; Pocock, K.F.; De Barros Lopes, M.; Williams, P.J.; Bacic, A.; Fincher, G.B.; Høj, P.B.; Waters, E.J. 2007. "Reducing haziness in white wine by overexpression of *Saccharomyces cerevisiae* genes YOL155c and YDR055w" *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73:1363-1376.
  - Bulawa, C.E. 1993. "Genetic and molecular biology of chitin synthesis in fungi" *Ann. Rev. Microbiol.* 47:505-534.
  - Burda, P.; Aebi, M. "The dolichol pathway of N-linked glycosylation" *Biochim. Biophys. Acta.* 1462:239-257.
  - Bussey, H. 1991. "K1 toxin, a pore-forming protein from yeast" *Mol. Microbiol.* 5:2339-2343.
  - Cabib, E.; Duran, A. 1975. "Simple and sensitive procedure for screening yeast mutants that lyse at nonpermissive temperatures" *J. Bacteriol.* 124:1604-1606.
  - Cabib, E.; Bowers, B.; Roberts, R.L. 1983. "Vectorial synthesis of a polysaccharide by isolated plasma membranes" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80:3318-3321.
  - Cabib, E.; Drgonova, J.; Drgon, T. 1998. "Role of small G proteins in yeast cell polarization and wall biosynthesis". *Annu. Rev. Biochem.* 67:307-33.



- Cabib, E.; Roh, G.H.; Schmidt, M.; Crotti, L.B.; Varma, A. 2001. "The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis" *J. Biol. Chem.* 23:19679-19682.
- Cana-Llauberes, R. M. 1993. "Enzyme in winemaking". En: "Wine Microbiology and Biotecnology", Fleet, G. H., Eds., Harwood Academic, Switzerland. 477-506.
- Cappellaro, C.; Mersa, V.; Tanner, W. 1998. "New potential cell wall glucanases of *Saccharomyces cerevisiae* and their involvement in mating" *J. Bacteriol.* 180:5030-5037.
- Caridi, A. 2006. "Enological functions of parietal yeast mannoproteins" *Antonie van Leeuwenhoek.* 89:417-422.
- Caridi, A.; Galvano, F.; Tafuri, A.; Ritieni, A. 2005. "Ochratoxin A removal during alcoholic fermentation. First International Conference on Environmental", Industrial and Applied Microbiology, BioMicroWorld 2005, Badajoz, Spain, 518 pp.
- Castillo, L.; Martinez, A. I.; Garcera, A.; Elorza, M. V.; Valentin, E.; Sentandreu, R. 2003. "Functional analysis of the cysteine residues and the repetitive sequence of *Saccharomyces cerevisiae* Pir4/Cis3: the repetitive sequence is needed for binding to the cell wall  $\beta$ -1,3-glucan". *Yeast* 20:973-983.
- Castor, J.G.B.; Archer, T.E. 1956. "Amino acids in must and wines: proline, serine and threonine" *Am. J. Enol. Viticult.* 7:19-25.
- Cebollero, E.; Gonzalez, R. 2004. "Comparison of two alternative dominant selectable marker for wine yeast transformation". *Appl. Environ. Microbiol.* 70:7018-7023.
- Chatonnet, P. 2000. "La contamination des vins par *Brettanomyces* au cours de la vinification et l'élevage : incidence, détection et moyens de lutte" *Rev. Œenol.* 96:23-26.
- Choi, W.J.; Santos, B.; Duran, A.; Cabib, E. 1994. "Are yeast chitin synthases regulated at the transcriptional or the posttranscriptional level?" *Mol. Cell. Biol.* 14:7685-7694.
- Chuang, J.S.; Schekman, R.W. 1996. "Differential trafficking and timed localization of two chitin synthase proteins, Chs2p and Chs3p". *J. Cell. Biol.* 135:597-610.

- Cid, V.J.; Duran, A.; del Rey, F.; Snyder, M.P.; Nombela, C.; Sanchez, M. 1995. "Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*" *Microbiol. Rev.* 59:345-386.
- Clarke, L.; Carbon, J. 1980. "Isolation of a yeast centromere and construction of functional small circular chromosomes". *Nature.* 287:504-509.
- Colagrande, O.; Silva, A.; Fumi, M. D. 1994. "Recent applications of biotechnology in wine production". *Biotechnol. Prog.* 10:2-18.
- Conzelmann, A.; Riezman, H.; Desponds, C.; Bron, C. 1988. "A major 125 kDa membrane glycoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is attached to the lipid bilayer through an inositol containing phospholipid" *EMBO J.* 7:2233-2240.
- Coulon, J.; Husnik, J.I.; Inglis, D.L.; van der Merwe, G.K.; Lonvaud, A.; Erasmus, D.J.; van Vuuren, H.J.J. 2006. "Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* to minimize the production of ethyl carbamate in wine" *Am. J. Enol. Vitic.* 57:113-124.
- Crouzet, J.; Flanzy, C.; Günata, Z.; Pellerin, P.; Sapis, J. C. 2000. "Las enzimas en enología". En: "Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos". AMV Ediciones y Ediciones Mundi-Prensa. 245-273.
- de Groot, P.W.J.; Ruiz, C.; Vázquez de Aldana, C.R.; Dueñas, E.; Cid, V.J.; del Rey, F.; Rodríguez-Peña, J.M.; Pérez, P.; Andel, A.; Caubín, J.; Arroyo, J.; García, J.C.; Gil, C.; Molina, M.; García, J.L.; Nombela, C.; Klis, F.M. 2001. "A genomic approach for the identification and classification of genes involved in cell wall formation and its regulation in *Saccharomyces cerevisiae*". *Comp. Funct. Genomics.* 2:124-142.
- de Nobel, J.G.; Klis, F.M.; Priem, J.; Munnik, T.; van den Ende, H. 1990. "The glucanase-soluble mannoproteins limit cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae*" *Yeast.* 6:491-499.
- de Nobel, J.G.; Ruiz, C.; Martin, H.; Morris, W.; Brul, S.; Molina, M.; Klis, F.M. 2000. "Cell wall perturbation in yeast results in dual phosphorylation of the Slt2/Mpk1 MAP kinase and in Slt2-mediated increase in *FKS2-LacZ* expression, glucanase resistance and thermotolerance. *Microbiology.* 146:2121-2132.
- Dean, N. 1999. Asparagine-linked glycosylation in the yeast Golgi". *Biochim. Biophys. Acta.* 1426:309-322.

- Delorme, E. 1989. "Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by electroporation". *Appl. Environ. Microbiol.* 55:2242-2246.
- Dijkgraaf, G.J.; Brown, J.L.; Bussey, H. 1996. "The *KNH1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* is a functional homolog of *KRE9*" *Yeast.* 12:683-692.
- Dijkgraaf, G.J.P.; Abe, M.; Ohya, Y.; Bussey, H. 2002. "Mutations in Fks1p affect the cell wall content of  $\beta$ -1,3- and  $\beta$ -1,6-glucan in *Saccharomyces cerevisiae*". *Yeast.* 19:671-690.
- Douglas, C.M.; Foor, F.; Marrinan, J.A.; Morin, N.; Nielsen, J.B.; Dahl, A.M.; Mazur, P.; Baginsky, W.; Li, W.; El-Sherbeini, M.; Clemas, J.A.; Mandala, S.M.; Frommer, B.R.; Kurtz, M.B. 1994. "The *Saccharomyces cerevisiae* *FKS1* (*ETG1*) gene encodes an integral membrane protein which is a subunit of 1,3- $\beta$ -D-glucan synthase" *Proc. Natl. Acad.* 91:12907-12911.
- Dupin, I.V.S.; Stockdale, V.J.; Williams, P.J.; Jones, G.P.; Markides, A.J.; Waters, E.J. 2000. "Saccharomyces cerevisiae mannoproteins that protect wine from protein haze: evaluation of extraction methods and immunolocalization". *J Agric. Food. Chem.* 48:1086-1095.
- Eglinton, J. M.; Heinrich, A. J.; Pollnitz., A. P.; Langridge, P.; Henschke, P. A.; de Barros Lopes, M. 2002. "Decreasing acetic acid accumulation by a glycerol overproducing strain of *Saccharomyces cerevisiae* by deleting the *ALD6* aldehyde dehydrogenase gene". *Yeast.* 19:295-301.
- Elorza, M.V.; Rico, H.; Sentandreu, P. 1983. "Calcofluor white alters the assembly of chitin fibrils in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* cells" *J. Gen. Microbiol.* 129:1577-1582.
- Eng, W.K.; Faucette, L.; McLaughlin, M.M.; Cafferkey, R.; Koltin, Y.; Morris, R.A.; Young, P.R.; Johnson, R.K.; Livi, G.P. 1994. "The yeast *FKS1* gene encodes a novel membrane protein, mutations in which confer FK506 and cyclosporin A hypersensitivity and calcineurin-dependent growth". *Gene.* 30:61-71.
- Escot S.; González, E.; Feuillat, M.; Charpentier, C. 2003. "Influence des mannoproteins d'origine levurienne sur l'aggregation des tanins" VII<sup>ème</sup> symposium international d'Œnologie (libro de resúmenes). Bordeaux 19-21 Juin.
- Escot, S.; Feuillat, M.; Dulau, L.; Charpentier, C. 2001. "Release of polysaccharides by yeast and the influence of the released polysaccharides on colour stability and wine astringency" *Aust. J. Grape Wine Res.* 7:153-157.

- Farrer, K. T. H. 1956. "The autolysis of yeast" *Food Sci. Abstracts*. 28:1-12.
- Feuillat M. 2003. "Yeast macromolecules: origin, composition and enological interest". *Am. J. Enol. Vitic.* 54:211-213.
- Feuillat, M.; Charpentier, C.; Nguyen Van Long, T. 1998. "Les manoprotéines de levures: un adjuvant œnologique possible". *Bull. O.I.V.* 71: 945-967.
- Feuillat, M.; Escot, S.; Charpentier, C.; Dulau, L. 2001. "Élevage des vins rouges sur lies fines. Intérêt des interactions entre polysaccharides de levure et polyphénols du vin" *Rev. Œenol.* 98:17-18.
- Feuillat, M. 1987. "Préparation d'autolysats de levures et addition dans les vins effervescents élaborés selon la méthode champenoise" *Rev. fr. oenol.* 109 :17-27.
- Fishel, B.R.; Sperry, A.O.; Garrard, W.T. 1993. "Yeast calmodulin and a conserved nuclear protein participate in the in vivo binding of a matrix association region" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5623-5627.
- Fraering, P.; Imhof, I.; Meyer, U.; Strub, J.M.; van Dorsselaer, A.; Vionnet, C.; Conzelmann, A. 2001. "The GPI transamidase complex of *Saccharomyces cerevisiae* contains Gaa1p, Gpi8p, and Gpi16p". *Mol. Biol. Cell.* 12: 3295-3306.
- Fujita, M.; Yoko-o, T.; Okamoto, M.; Jigami, Y. 2004. "GPI7 involved in glycosylphosphatidylinositol biosynthesis is essential for yeast cell separation" *J. Biol. Chem.* 279:51863-51879.
- Fukuda, K.; Asano, K.; Ouchi, K.; Takasawa, S. 1992. "Feedback-insensitive mutation of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase caused by a single nucleotide substitution of *ARO4* structural gene in *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Ferment. Bioeng.* 74:117-119.
- Ganga, M. A.; Pinaga, F.; Valles, F.; Ramón, D.; Querol, A. 1999. "Aroma improving in microvinification processes by the use of a recombinant wine yeast strain expressing the *Aspergillus nidulans xlnA* gene". *Int. J. Food. Microbiol.* 47:171-178.
- García-Rodríguez, L.J.; Trilla, J.A.; Castro, C.; Valdivieso, M.H.; Durán, A.; Roncero, C. 2000. "Characterization of the chitin biosynthesis process as a compensatory mechanism in the *fks1* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*" *FEBS Lett.* 478:84-88.

- Geiser, M.; Cebe, R.; Drewello, D.; Schmitz, R. 2001. "Integration of PCR fragments at any specific site within cloning vectors without the use of restriction enzymes and DNA ligase". *BioTechniques*. 31:88-92.
- Gentzsch, M.; Tanner, W. 1997. "Protein-O-glycosylation in yeast: protein-specific mannosyltransferases". *Glycobiology* 7:481-486.
- Gershon, H.; Gershon, D. 2000. "The budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, as a model for ageing research: a critical review". *Mech. Ageing Dev.* 120:1-22.
- Goffeau, A.; Barrell, B.G.; Bussey, H.; Davis, R.W.; Dujon, B.; Feldmann, H.; Galibert, F.; Hoheisel, J. D.; Jacq, C.; Johnston, M.; Louis, E. J.; Mewes, H. W.; Murakami, Y.; Philippsen, P.; Tettelin, H. y Oliver, S. G. 1996. "Life with 6000 genes". *Science*. 274:563-567.
- Goldman, R.C.; Sullivan, P.A.; Zakula, D.; Capobianco, J.O. 1995. "Kinetics of beta-1,3-glucan interaction at the donor and acceptor sites of the fungal glucosyltransferase encoded by the *BGL2* gene" *Eur. J. Biochem.* 227:372-378.
- Grandori, R.; Popolo, L.; Vai, M.; Alberghina, L. 1990. "cAMP promotes the synthesis in early G1 of gp115, a yeast glycoprotein containing glycosyl-phosphatidylinositol" *J. Biol. Chem.* 265:14315-14320.
- Guilloux-Benatier, M.; Chassagne, D. 2003. "Comparison of components released by fermented or active dried yeasts after aging on lees in a model wine". *J. Agric. Food Chem.* 51:746-751.
- Guilloux-Benatier, M.; Guerreau, J.; Feuillat, M. 1995. "Influence of initial colloid content on yeast macromolecule production and on the metabolism of wine microorganisms". *Am J. Enol. Vitic.* 46:486-492.
- Hadfield, C.; Jordan, B. E.; Mount, R. C.; Pretorius, G. H.; Burak, E. 1990. "G418-resistance as a dominant marker and reporter for gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*". *Curr. Genet.* 18:303-313.
- Haight, K.G.; Gump, B. H. 1994. "The use of maceration enzymes in grape juice processing". *Am. J. Enol. Vitic.* 45:113-116.
- Hashimoto, S.; Ogura, M.; Aritomi, K.; Hoshida, H.; Nishizawa, Y.; Akada, R. 2005. "Isolation of auxotrophic mutants of diploid industrial yeast strains after UV mutagenesis". *Appl. Environ. Microbiol.* 71:312-319.

- Heinisch, J.J.; Lorberg, A.; Schmitz, H.P.; Jacoby, J.J. 1999. "The protein kinase C-mediated MAP kinase pathway involved in the maintenance of cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*". *Mol. Microbiol.* 32:671-80.
- Henschke, P.A.; Jiranek, V. 1993. "Metabolism of nitrogen compounds", 77-164. En Fleet, G.H. (ed.), "Wine Microbiology and Biotechnology". Harwood Academic Publishers. Chur. SW.
- Hinnen, A.; Hicks, J. B.; Fink, G. R. 1978. "Transformation of yeast". *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 75:1929-1933.
- Hirosawa, I.; Aritomi, K.; Hoshida, H.; Kashiwagi, S.; Nishizawa, Y.; Akada, R. 2004. "Construction of a self-cloning sake yeast that overexpresses alcohol acetyltransferase gene by a two-step gene replacement protocol". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65:68-73.
- Hong, Z.; Mann, P.; Brown, N. H.; Tran, L. E.; Shaw, K. J.; Hare, R. S.; Didomenico, B. 1994a. "Cloning and characterization of *KNR4*, a yeast gene involved in (1,3)-b-glucan synthesis" *Mol. Cell. Biol.* 14:1017-1025.
- Hong, Z.; Mann, P.; Shaw, K. J.; Didomenico, B. 1994b. "Analysis of b-glucans and chitin in a *Saccharomyces cerevisiae* cell wall mutants using high-performance liquid chromatography" *Yeast* 10:1083-1092.
- Horwitz, J. P.; Chua, J.; Curby, R. J.; Tomson, A. J.; DaRooge, M. A.; Fisher, B. E.; Mauricio, J.; Klundt, I. 1964. "Substrates for cytochemical demonstration of enzyme activity. Some substituted 3-indolyl- $\beta$ -D-glycopyranosides". *J. Med. Chem.* 7:574-575.
- Hsu, J.C.; Heatherbell, D.A. 1987. "Heat-unstable proteins in wine I. Characterization and removal by bentonite fining and heat treatment" *Am. J. Enol. Vitic.* 38:11-16.
- Hutchins, K.; Bussey, H. 1983. "Cell wall receptor for yeast killer toxin: involvement of (1 $\rightarrow$  6)- $\beta$ -D-glucan" *J. Bacteriol.* 154:161-169.
- Imhof, I.; Flury, I.; Vionnet, C.; Roubaty, C.; Egger, D.; Conzelmann, A. 2004. "Glycosylphosphatidylinositol (GPI) proteins of *Saccharomyces cerevisiae* contain ethanolamine phosphate groups on the  $\alpha$ -1,4-linked mannose of the GPI anchor" *J. Biol. Chem.* 279:19614-19627.

- Ishihara, S.; Hirata, A.; Nogami, S.; Beauvais, A.; Latge, J.P.; Ohya, Y. 2007. "Homologous subunits of 1,3-beta-glucan synthase are important for spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*" *Eukaryotic Cell*. 6:143-156.
- Ito, H.; Fukada, Y.; Murata, K.; Kimura, A. 1983. "Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations". *J. Bacteriol.* 153:163-168.
- Jackson, R.S. 1994. "Wine science. Principles and applications". Academic Press. San Diego.
- Jiménez, A.; Davies, J. 1980. "Expression of a transposable antibiotic resistance element in *Saccharomyces*". *Nature*. 287:869-871.
- Jung, U.S.; Levin, D.E. 1999. "Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signalling pathway". *Mol. Microbiol.* 34:1049-1057.
- Kang, M.S.; Cabib, E. 1986. "Regulation of fungal cell wall growth: A guanine nucleotide-binding, proteinaceous component required for activity of (1-3)- $\beta$ -D-glucan synthase". *Proc. Natl. Acad.* 83:5808-5812.
- Kapteyn, J. C.; van den Ende, H.; Klis, F. M. 1999. "The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall" *Biochim. Biophys. Acta* 1426:373-383.
- Klis, F. 1994. "Review: cell wall assembly in yeast". *Yeast*. 10:851-869.
- Klis, F.M.; Boorsma, A.; De Groot, P.W.J. 2006. "Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*" *Yeast*. 23:185-202.
- Klis, F.M.; Mol, P.; Hellingwerf, K.; Brul, S. 2002. "Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*". *FEMS Microbiol. Rev.* 26:239-256.
- Klis, F.M.; Ram, A.F.J.; Montijn, R C.; Kapteyn, J.C.; Caro, L.H.P.; Vossen, J.H.; Van Berkel, M.A.A.; Brekelmans, S.S.C.; Van den Ende, H. 1998. "Posttranslational modifications of secretory proteins". pp. 223-238. *En Methods in Microbiology*; Academic Press: New York.
- Kopecka, M.; Gabriel, M. 1992. "The influence of Congo Red on the cell wall and (1-3)- $\beta$ -D-glucan microfibril biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*" *Arch. Microbiol.* 158:115-126.
- Kukuruzinska, M.A.; Robbins, P.W. 1987. "Protein glycosylation in yeast: transcript heterogeneity of the *ALG7* gene" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:2145-2149.

- Laemli, U.K. 1970. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4" *Nature*. 227:680-685.
- Lagace, L.S.; Bisson, F. 1990. "Survey of Yeast acid proteases for effectiveness of wine haze reduction". *Am. J. Enol. Vitic.* 41:147- 155.
- Lagorce, A.; Hauser, N.C.; Labourdette, D.; Rodriguez, C.; Martin-Yken, H.; Arroyo, J.; Hoheisel, J.D.; François, J. 2003. "Genome-wide analysis of the response to cell wall mutations in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*" *J. Biol. Chem.* 278:20345-20357.
- Lagunas, R. 1986. "Misconceptions about the energy metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*" *Yeast*. 2:221-228.
- Ledoux, V.; Dulau, L.; Dubourdieu, D. 1992. "Interprétation de l'amélioration de la stabilité protéique des vins au cours de l'élevage sur lies". *J. Int. Sc. Vigne Vin*. 26:239-251.
- Lesage, G.; Bussey, H. 2006 "Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*" *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70:317-343.
- Levin, D.E. 2005. "Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*" *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69:262-291.
- Levinson, J.N.; Shahinian, S.; Sdicu, A.M.; Tessier, D.C.; Bussey, H. 2002. "Functional, comparative and cell biological analysis of *Saccharomyces cerevisiae* Kre5p" *Yeast*. 19:1243-1259.
- Lilly, M.; Lambrechts, M. G.; Pretorius, I. S. 2000. "Effect of increased yeast alcohol acetyltransferase activity on flavor profiles of wine and distillates". *Appl. Environ. Microbiol.* 66:744-753.
- Lipke, P. N.; Kurjan, J. 1992. "Sexual agglutination in budding yeasts: structure, function, and regulation of adhesion glycoproteins". *Microbiol.Rev.* 56:180-194.
- Lipke, P. N.; Ovalle, R. 1998. "Cell wall architecture in yeast: new structure and challenges" *J. Bacteriol.* 180:3735-3740.
- Lu, C.F.; Montijn, R.C.; Brown, J.L.; Klis, F.; Kurjan, J.; Bussey, H.; Lipke, P.N. 1995. "Glycosyl phosphatidylinositol-dependent cross-linking of alpha-agglutinin and beta 1,6-glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall". *J. Cell. Biol.* 128:333-340.



- Lubbers, S.; Voilley, A.; Feuillat, M.; Charpentier, C. 1994. "Influence of mannoproteins from Yeast on the aroma intensity of a model wine". *Debensm.-Wiss.u.-Technol.* 27:108-114.
- Manzanares, P.; Orejas, M.; Gil, J. V.; de Graaff, L. H.; Visser, J.; Ramón, D. 2003. "Construction of a genetically modified wine yeast strain expressing the *Aspergillus aculeatus rhaA* gene, encoding an alpha-L-rhamnosidase of enological interest". *Appl. Environ. Microbiol.* 69:7558-7562.
- Markovich, S.; Yekutieli, A.; Shalit, I.; Shadkchan, Y.; Osherov, N. 2004. "Genomic approach to identification of mutations affecting caspofungin susceptibility in *Saccharomyces cerevisiae*" *Antimicrob. Agents. Chemother.* 48:3871-3876.
- Martin, H.; Dagkessamanskaia, A.; Satchanska, G.; Dallies, N.; Francois, J. 1999. "*KNR4*, a suppressor of *Saccharomyces cerevisiae* cwh mutants, is involved in the transcriptional control of chitin synthase genes". *Microbiology* 145:249-258.
- Martin-Yken, H.; Dagkessamanskaia, A.; Basmaji, F.; Lagorce, A.; Francois, J. 2003. "The interaction of Slt2 MAP kinase with Knr4 is necessary for signaling through the cell wall integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*" *Mol. Microbiol.* 49:23-35.
- Mazur, P.; Morin, N.; Baginsky, W.; El-Sherbeini, M.; Clemas, J.; Nielsen, J.; Foor, F. 1995. "Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1,3- $\beta$ -D-glucan synthase" *Mol. Cell. Biol.* 15:5671-5681.
- Meaden, P.; Hill, K.; Wagner, J.; Slipetz, D.; Sommer, S.S.; Bussey, H. 1990. "The yeast *KRE5* gene encodes a probable endoplasmic reticulum protein required for (1 $\rightarrow$  6)- $\beta$ -D-glucan synthesis and normal cell growth" *Mol. Cell. Biol.* 10:3013-3019.
- Michnick, S.; Rousan, J. L.; Remize, F.; Barre, P.; Dequin, S. 1997. "Modulation of glycerol and ethanol yields during alcoholic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressed or disrupted for *GPD1* encoding glycerol 3-phosphate dehydrogenase". *Yeast.* 13:783-793.
- Mirabel, M.; Saucier, C.; Guerra, C.; Glories, Y. 1999. "Copigmentation in model wine solutions: occurrence and relation to wine ageing" *Am J. Enol. Vitic.* 50:211-218.

- Moine-Ledoux, V., Perrin, A., Paladin, I., Dubourdieu, D. 1997. "First result of tartaric stabilization by adding mannoproteins (Mannostab®)". *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 3:23-31.
- Moine-Ledoux, V.; Dubourdieu, D. 1999. "An invertase fragment responsible for improving the protein stability of dry white wines". *J. Sci. Food Agric.* 79:537-543.
- Moine-Ledoux, V.; Dubourdieu, D. 2002. "A mannoprotein with a glycosylphosphatidyl-inositol substituent, responsible for tartrate stabilization of wines. Recent industrial developments" *Rev. Franç. Oenol.* 193:32-35
- Molero, G.; Yuste-Rojas, M.; Montesi, A.; Vazquez, A.; Nombela, C.; Sanchez, M. 1993. "A cdc-like autolytic *Saccharomyces cerevisiae* mutant altered in budding site election is complemented by SPO12, a sporulation gene". *J. Bacteriol.* 175:6562-6570.
- Montijn, R.C.; Vink, E.; Müller, M.H.; Verkleij, A.J.; Van den Ende, H.; Henrissat, B.; Klis, F.M. 1999. "Localization of synthesis of  $\beta$ -1,6-glucan in *Saccharomyces cerevisiae*" *J. Bacteriol.* 181:7414-7420.
- Moreno, I.; Pedreño, Y.; Maicas, S.; Sentandreu, R.; Herrero, E.; Valentin, E. 2003. "Characterization of a *Candida albicans* gene encoding a putative transcriptional factor required for cell wall integrity". *FEMS Microbiol. Lett.* 226:159-167.
- Mouyna, I.; Fontaine, T.; Vai, M.; Mono, M.; Fonzi, W.A.; Diaquin, M.; Popolo, L.; Hartland R.P.; Latgé, J.P. 2000. "Glycosylphosphatidylinositol-anchored glucanotransferases play an active role in the biosynthesis of the fungal cell wall". *J. Biol. Chem.* 275:14882-14889.
- Nishino, H.; Miyazaki, S.; Tohjo, K.; 1985. "Effect of osmotic pressure on the growth rate and the fermentation activity of wine yeast" *Am. J. Enol. Viticult.* 36:170-174.
- Nuoffer, C.; Jenö, P.; Conzelmann, A.; Riezman, H. 1991. "Determinants for glycosylphospholipid anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* GSI protein to the plasma membrane". *Mol. Cell. Biol.* 11:27-37.
- Ough, C.S. 1992. "Winemaking basics" The Haworth Press Inc. Binghamton, New York.
- Ough, C.S. Amerine, M.A. 1988. "Nitrogen compounds. Methods for analysis of must and wines" Segunda edición. John Wiley and sons. University of California.

- Parent, S.A.; Nielsen, J.B.; Morin, N.; Chrebet, G.; Ramadan, N.; Dahl, A.M.; Hsu, M.J.; Bostian, K.A.; Foor, F. 1993. "Calcineurin-dependent growth of an FK506- and CsA-hypersensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Gen. Microbiol.* 139:2973-2984.
- Park, H.; López, N. I.; Bakalinsky, A. T. 1999. "Use of sulfite resistance in *Saccharomyces cerevisiae* as a dominant selectable marker". *Curr. Genet.* 36:339-344.
- Pellerin, P.; Waters, E.; Brillouet J.M.; Montounet, M. 1994. "Effet de polysaccharides sur la formation de trouble protéique dans un vin blanc". *J. Int. Sci. Vigne Vin.* 28:213-225.
- Pérez-González, J. A.; de Graaff, L.; Visser, J.; Ramón, D. 1996. "Molecular cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of two *Aspergillus nidulans* xylanase genes". *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2179-2182.
- Pérez-González, J. A.; González, R.; Querol, A.; Sendra, J.; Ramón, D. 1993. "Construction of a recombinant wine yeast strain expressing beta-(1,4)-endoglucanase and its use in microvinification processes". *Appl. Environ. Microbiol.* 59:2801-2806.
- Pittet, M.; Conzelmann, A. 2007. "Biosynthesis and function of GPI anchored proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*" *Biochim. Biophys. Acta.* 1771:405-420.
- Pockock, K.F.; Høj, P.B.; Adams, K.S.; Kwiatkowski, M.J.; Waters, E.J. 2003. "Combined heat and proteolytic enzyme of white wines reduces haze forming protein content without detrimental effect" *Australian Journal Of Grape And Wine Research* 9:56-63.
- Pocock, K.F.; Alexander, G.M.; Hayasaka, Y.; Jones, P.R.; Waters. E.J. 2007. "Sulfate a candidate for the missing essential factor that is required for the formation of protein haze in white wine" *J. Agric. Food Chem.* 55:1799-1807.
- Popolo, L.; Gilardelli, D.; Bonfante, P.; Vai, M. 1997. "Increase in chitin as an essential response to defects in assembly of cell wall polymers in the *ggp1delta* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*" *J. Bacteriol.* 179:463-469.
- Popolo, L.; Vai, M. 1999. "The Gas1 glycoprotein, a putative wall polymer cross-linker" *Biochim. Biophys. Acta.* 1426:385-400.

- Popolo, L.; Vai, M.; Gatti, E.; Porello, S.; Bonfante, P.; Balestrini, R.; Alberghina, L. 1993. "Physiological analysis of mutants indicates involvement of the *Saccharomyces cerevisiae* GPI-anchored protein gp115 in morphogenesis and cell separation" *J. Bacteriol.* 175:1879-1885.
- Pretorius, I. S. 2000. "Tailoring wine yeast to the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast.* 16:675-729.
- Puig, S.; Pérez-Ortín, J.E. 2000. "Stress response and expression patterns in wine fermentations of yeast genes induced at the diauxic shift" *Yeast.* 16:139-148.
- Puig, S.; Ramón, D.; Pérez-Ortín, J. E. 1998. "Optimized method to obtain stable food-safe recombinant wine yeast strains". *J. Agric. Food Chem.* 46:1689-1693.
- Puig, S.; Ramon, D.; Perez-Ortin, J.E. 1998. "Optimized method to obtain stable food-safe recombinant wine yeast strains". *J. Agr. Food Chem.* 46:1689-1693.
- Querol, A.; Barrio, E.; Ramon, D. 1992. "A comparative study of different methods of yeast strain characterization". *Syst. Appl. Microbiol.* 15:439-446.
- Radler, F. 1990. "Possible use of nisin in winemaking. II. Experiments to control lactic acid bacteria in production of wine". *Am. J. Enol. Vitic.* 41:7-11.
- Ram, A.F.J.; Kapteyn, J.C.; Montijn, R.C.; Caro, H.P.; Douwes, J.E.; Baginsky, W.; Mazur, P.; van den Ende, H.; Klis, F.M. 1998. "Compensation mechanism to ensure cell wall integrity" *J. Bacteriol.* 180:1418-1424.
- Ram, A.F.J.; Wolters, A.; Ten Hoopen, R.; Klis, F.M. 1994. "A new approach for isolating cell wall mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by screening for hypersensitivity to calcofluor white" *Yeast.* 10:1019-1030.
- Remize, F.; Roustan, J. L.; Sablayrolles, J. M.; Barre, P.; Dequin, S. 1999. "Glycerol overproduction by engineered *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains leads to substantial changes in by-product formation and to a stimulation of fermentation rate in stationary phase". *Appl. Environ. Microbiol.* 65:143-149.
- Ribéreau-Gayon, P.; Dubourdieu, D.; Donèche, B.; Lonvaud, A. 2000. "Handbook of enology". Vol 1. "The Microbiology of wine and vinifications". Wiley & Sons. England.
- Richard, M.; de Groot, P.; Courtin, O.; Poulain, D.; Klis, F.; Gaillardin, C. 2002. "GPI7 affects cell-wall protein anchorage in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*". *Microbiology* 148:2125-2133.

- Robinson, S.P.; Jacobs, A.K.; Dry, I.B. 1997. "A class IV chitinase is highly expressed in grape during ripening" *Plant Physiol.* 114:771-778.
- Roemer, T.; Bussey, H. 1991. "Yeast beta-glucan synthesis: *KRE6* encodes a predicted type II membrane protein required for glucan synthesis *in vivo* and for glucan synthase activity *in vitro*" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 15:11295-11299.
- Roemer, T.; Paravicini, G.; Payton, M.A.; Bussey, H. 1994. Characterization of the yeast (1→ 6)-β-D-glucan biosynthetic components, Kre6p and Skn1p, and genetic interactions between the PKC1 pathway and extracellular matrix assembly" *J. Cell. Biol.* 127:567-579.
- Roncero, C.; Valdivieso, M.H.; Ribas, J.C.; Duran, A. 1988. "Effect of calcofluor white on chitin synthases from *Saccharomyces cerevisiae*" *J. Bacteriol.* 170:1945-1949.
- Rosi, I.; Gheri, A.; Domizio, P.; Fia, G. 1999. "Formation of cell wall macromolecules by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation and their influence on malolactic fermentation". *Revue des Oenologues et des Techniques Vitivinicoles et Oenologiques.* 94:18-20.
- Salzman, R.A.; Tikhonova, I.; Bordelon, B.P.; Hasegawa, P.M.; Bressan, R. 1998. "Coordinate accumulation of antifungal proteins and hexoses constitutes a developmentally controlled defense response during fruit ripening in grape" *Plant Physiol.* 117:465-472.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. 1998. *En* Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd 609 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold 610 Spring Harbor, N.Y.
- Sánchez-Torres, P.; González-Candelas, L.; Ramón, D. 1996. "Expression in a wine yeast strain of the *Aspergillus niger abfB* gene". *FEMS Microbiol. Lett.* 145:189-194.
- Saucier, C.; Glories, Y.; Roux, D. 1999. "Tannin-colloid interactions: new advances concerning the concept of good and bad tannins". *Revue des Oenologues et des Techniques Vitivinicoles et Oenologiques.* 94:9-10.
- Schoeman, H.; Vivier, M. A.; Du Toit, M.; Dicks, L. M.; Pretorius, I. S. 1999. "The development of bactericidal yeast strains by expressing the *Pediococcus acidilactici* pediocin gene (*pedA*) in *Saccharomyces cerevisiae*". *Yeast.* 15:647-656.

- Scott, P.M.; Kanhere, S.R.; Lawrence, G.A.; Daley, E.F.; Farber, J.M. 1995. "Fermentation of wort containing added ochratoxin A and fumonisins B1 and B2". *Food Addit. Contam.* 12:31-40.
- Segarra, I.; Lao, C.; López-Tamames, E.; de la Torre-Boronat, M.C. 1995. "Spectrophotometric methods for the analysis of polysaccharide levels in winemaking products" *Am J. Enl. Vitic.* 46:564-570.
- Shahinian, S.; Bussey, H. 2000. "Beta-1,6-glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*" *Mol. Microbiol.* 35(3):477-489.
- Shaw, J.A.; Mol, P.C.; Bowers, B.; Silverman, S.J.; Valdivieso, M.H.; Duran, A.; Cabib, E. 1991. "The function of chitin synthases 2 and 3 in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle" *J. Cell. Biol.* 114:111-123.
- Sherman, F. 1998. "An introduction to the genetics and molecular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*"  
[http://dbb.urmc.rochester.edu/labs/sherman\\_f/yeast/index.html](http://dbb.urmc.rochester.edu/labs/sherman_f/yeast/index.html).
- Shimoi, H.; Iimura, Y.; Obata, T. 1995. "Molecular cloning of CWP1 a gene encoding a *Saccharomyces cerevisiae* cell-wall protein solubilized with *Rarobacter faecitabidus* protease-P" *J. Biochem.* 118:302-311.
- Shimura, K.; Fukada, K.; Ouchi, K. 1993. "Genetic transformation of industrial yeasts using an amino acid analog resistance gene as a directly selectable marker". *Enzyme Microb. Technol.* 15:874-876.
- Smith, A.E.; Zhang, Z.; Thomas, C.R.; Moxham, K.E.; Middelberg, A.P. 2000. "The mechanical properties of *Saccharomyces cerevisiae*" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:9871-9874.
- Smits, G.J.; van den Ende, H.; Klis, F.M. 2001 "Differential regulation of cell wall biogenesis during growth and development in yeast" *Microbiology.* 147:781-794.
- Spellman, P. T.; Sherlock, G.; Zhang, M. Q.; Iyer, V. R.; Anders, K.; Eisen, M. B.; Brown, P. O.; Botstein, D.; Futcher, B. 1998. "Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization". *Mol. Biol. Cell.* 9:3273-3297.
- Spencer, J. F. T.; Spencer, D. M. 1983. "Genetic improvement of industrial yeasts. *Ann. Rev. Microbiol.* 37:121-142.

- Strahl-Bolsinger, S.; Gentzs, M.; Tanner, W. 1999. "Protein O-Manosylation" *Biochim. Biophys. Acta.* 1426:297-307.
- Struhl, K., Stinchcomb, D. T.; Scherer, S.; Davis, R. W. 1979. "High-frequency transformation of yeast: autonomous replication of hybrid DNA molecules". *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 76:1035-1039.
- Swiegers, J.H.; Capone, D.L.; Pardon, K.H.; Elsey, G.M.; Sefton, M.A.; Francis, I.L.; Pretorius, I.S. 2007. "Engineering volatile thiol release in *Saccharomyces cerevisiae* for improved wine aroma" *Yeast.* 24:561-574.
- Szostak, J. W.; Blackburn, E. H. 1982. "Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors". *Cell.* 29:245-255.
- Tabera, L.; Muñoz, R.; Gonzalez, R. 2006. "Deletion of BCY1 from the *Saccharomyces cerevisiae* genome is semidominant and induces autolytic phenotypes suitable for improvement of sparkling wines". *Appl. Environ. Microbiol.* 72:2351-2358.
- Tanner, W.; Lehle, L. 1987. "Protein glycosylation in yeast" *Biochim. Biophys. Acta.* 906:81-99.
- Tattersall, D.B.; Heeswijck, R.; Høj, P.B. 1997. "Identification and characterization of a fruit-specific, thaumatin-like protein that accumulates at very high levels in conjunction with the onset of sugar accumulation and berry softening in grapes". *Plant Physiol.* 114:759-769.
- Terashima, H.; Yabuki, N.; Arisawa, M.; Hamada, K.; Kitada, K. 2000. "Up-regulation of genes encoding glycosylphosphatidylinositol (GPI)-encoding proteins in response to cell wall damage caused by disruption of *FKS1* in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*" *Mol. Gen. Genet.* 264:64-74.
- Toland, T.M.; Fugelsang, K.C.; Muller, C.J. 1996. "Methods for estimating protein instability in white wines: A comparison". *Am. J. Enol. Vitic.* 47:111-112.
- Ullmann, A.; Jacob, F.; Monod, J. 1967. "Characterization by *in vitro* complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the  $\beta$ -galactosidase structural gene of *Escherichia coli*". *J. Mol. Biol.* 24: 339-343.
- Valdivieso, M.H.; Ferrario, L.; Vai, M.; Duran, A.; Popolo, L. 2000. "Chitin synthesis in a *gas1* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*" *J. Bacteriol.* 182:4752-4757.

- van der Vaart, J.M.; Caro, L.H.; Chapman, J.W.; Klis, F.M.; Verrips, C.T. 1995. "Identification of three mannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*" *J. Bacteriol.* 177:3104-3110.
- Vanrell, G.; Canals, R.; Esteruelas, M.; Fort, F.; Canals, J.M.; Zamora, F. 2007. "Influence of the use of bentonite as a riddling agent on foam quality and preprotein fraction of sparkling wines (Cava)" *Food Chem.* 104:148-155.
- Vasquez de Aldana, C. R.; Correa, J.; San Segundo, P.; Bueno, A.; Nebreda, A. R.; Mendez, E.; del Rey, F. 1991. "Nucleotide sequence of the *exo-1,3-beta-glucanase*-encoding gene, *EXG1*, of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*". *Gene* 97:173-182.
- Verstrepen, K. J.; G. Derdelinckx, Verachtert, H.; Delvaux, F. R. 2003a. "Yeast flocculation: what brewers should know. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61:197-205.
- Verstrepen, K. J.; van Laere, S. D.; Vanderhaegen, B. M.; Derdelinckx, G.; Dufour, J. P.; Pretorius, I. S.; Winderickx, J.; Thevelein, J. M.; Delvaux, F. R. 2003. "Expression levels of the yeast alcohol acetyltransferase genes *ATF1*, *Lg-ATF1*, and *ATF2* control the formation of a broad range of volatile esters". *Appl. Environ. Microbiol.* 69:5228-5237.
- Vilanova, M.; Blanco, P.; Cortés, S.; Castro, M.; Villa, T.G., Sieiro, C. 2000. "Use of a *PGUI* recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain in oenological fermentations" *J. Appl. Microbiol.* 89:876-883.
- Vincenzi, S.; Polesani, M.; Curioni, A. 2005. "Removal of specific protein components by chitin enhances protein stability in white wine" *Am. J. Enol. Vitic.* 56:246-254.
- Vivas, N.; Saint-Cricq de Gaulejac, N. 2001. "Effects of different winemaking tannins on formation of protein haze in white wines" *Revue des oenologues et des techniques vitivinicoles et oenologiques.* 100:25-27.
- Vossen, J.H.; Müller, W.H.; Lipke, P.N.; Klis, F.M. 1997. "Restrictive glycosylphosphatidylinositol anchor synthesis in *cwh6/gpi3* yeast cells causes aberrant biogenesis of cell wall proteins." *J. Bacteriol.* 179:2202-2209.
- Waters, E.; Dupin, I.; Stockdale, V. 2000. "A review of current knowledge on polysaccharides which protect wine against haze in white wine". *The Australian grapegrower and winemaker.* Annual technical issue 2000. 13-16.



- Waters, E.J.; Alexander, G.; Muhlack, R.; Pocock, K.F.; Colby, C.; O'Neill, B.K.; Høj, P.B.; Jones, P. 2005. "Preventing protein haze in bottled white wine" *Australian Journal Of Grape And Wine Research* 11:215-225.
- Waters, E.J.; Pellerin, P.; Brillouet, J.M. 1994. "A *Saccharomyces* mannoprotein that protects wine from protein haze". *Carbohydr. Polym.* 23:185-191.
- Waters, E.J.; Shirley, N.J.; Williams, P.J. 1996. "Nuisance proteins of wine are grape pathogenesis-related proteins". *J. Agric. Food Chem.* 44:3-5.
- Waters, E.J.; Wallace, W.; Williams, P.J. 1991. "Heat haze Characteristics of Fractionated wine proteins" *Am. J. Enol. Vitic.* 42:123-127.
- Waters, E.J.; Wallace, W.; Williams, P.J. 1992. "Identification of heat unstable wine proteins and their resistance to peptidase" *J. Agric. Food Chem.* 40:1514-1519.
- Webster, T. D.; Dickson, R. D. 1983. "Direct selection of *Saccharomyces cerevisiae* resistant to the antibiotic G418 following transformation with a DNA vector carrying the kanamycin-resistance gene of Tn903". *Gene.* 26:243-252.
- Werner-Washburne, M.; Barun, E.; Johnston, G.C.; Singer, R.A. 1993. "Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*". *Microbiol. Rev.* 57:383-401.
- Yamamoto, T.; Hiratani, T.; Hirata, H.; Imai, M.; Yamaguchi, H. 1986. "Killer toxin from *Hansenula mrakii* selectively inhibits cell wall synthesis in a sensitive yeast" *FEBS Lett.* 197:50-54.
- Yamamoto, T.; Uchida, K.; Hiratani, T.; Miyazaki, T.; Jaqui, J.; Yamaguchi, H. 1988. "In vitro activity of the killer toxin from the yeast *Hansenula mrakii* against yeasts and molds" *J. Antibiot.* 41:398-403.
- Zamora, F. 2005. "Las manoproteínas: origen e interés enológico" *Enólogos.* 36. <http://www.enologo.com/tecnicos/eno36/eno36.html>
- Zhu, Y.; Vionnet, C.; Conzelmann, A. 2006. "Ethanaminephosphate side chain added to glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor by Mcd4p is required for ceramide remodeling and forward transport of GPI proteins from endoplasmic reticulum to Golgi" *J. Biol. Chem.* 281:19830-19839.
- Zimmerli B.; Dick R. 1996. "Ochratoxin A in table wine and grape-juice: occurrence and risk assessment". *Food Addit. Contam.* 13:655-668.



Reunido el tribunal que suscribe en el día  
de la fecha, acordó calificar la presente Tesis  
doctoral con SOBRESALIENTE CUM LAUDE

MADRID 21/11/08